

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

Papel de la γ -glutamyl-cistein ligasa en modelos de daño vascular y fibrótico e implicación de miR-433 en la síntesis de glutatión

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

María Cristina Espinosa Díez

Director

Santiago Lamas Peláez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Papel de la γ -glutamyl-cistein ligasa en modelos de daño vascular y fibrótico e implicación de miR-433 en la síntesis de glutación

Memoria realizada por

M^a Cristina Espinosa Diez

Para optar al grado de Doctor en Bioquímica
Realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
(CBMSO-CSIC) bajo la dirección del Dr. Santiago Lamas Peláez

VºBº del director de la tesis

VºBº del interesado

Santiago Lamas Peláez

Cristina Espinosa Diez

D. SANTIAGO LAMAS PELÁEZ, Profesor de Investigación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (España)

CERTIFICA

Que Dña. Cristina Espinosa Díez, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis Doctoral titulado: **“Papel de la γ -glutamyl-cistein ligasa en modelos de daño vascular y fibrótico e implicación de miR-433 en la síntesis de glutatión”** y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid.

EL DIRECTOR

Fdo : Santiago Lamas Peláez

A mi familia y amigos, por respetar mi locura.
A mi compañero de aventuras, por embarcarse
conmigo en una.

¿Qué es la vida? Un frenesí. ¿Qué es la vida? Una ilusión, una sombra, una ficción; y el mayor bien es pequeño; que toda la vida es sueño, y los sueños, sueños son.

La vida es sueño

Pedro Calderon de la Barca

La frase mas excitante que se puede oir en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino 'Es extraño ..'.

Isaac Asimov

Agradecimientos



Agradecimientos

Me voy con mi música a otra parte. Se cierra una etapa, que como todas las etapas de la vida ha tenido momentos buenos, alegres y felices y otros no tanto. Pero como buenos científicos y seres humanos debemos sacar conclusiones de cada momento vital. La conclusión más importante que he sacado yo en estos cinco años es que jamás hubiese llegado sola hasta aquí y que a todas y cada una de las personas que han pasado por mi vida en estos años les debo un especial homenaje por haberme ayudado a saltar los obstáculos que cada día nos vamos encontrando en el camino con una sonrisa.

La primera persona que se merece toda mi gratitud y sin la cual probablemente no estaría aquí, es Santiago. Esta tesis es casi más mérito tuyo que mío, yo empecé a ciegas y en este tiempo has sabido guiarme e iluminarme y sacar lo mejor de mí. Gracias Santiago porque ha sido un verdadero placer poder trabajar para ti y contigo, por todo el tiempo que me has dedicado y todo lo que me has enseñado, por conseguir que creyese un poquito más en mí, por ser tan generoso y humano y preocuparte por todos y cada uno de nosotros y por hacernos sonreír y sorprendernos con ese humor tan tuyo.

A Fernando, por siempre echar una mano cuando me he enfrentado a problemas genómicos y fibróticos, por su feedback y colaboración.

A Estrelli, porque sin ella no existiría ni el 427, ni el 103. Gracias Estrelli sonrío siempre.

Dame una M, dame una A: MA!! A Mari Angeles por ser pura dulzura, gran compañera y consejera, profesora y amiga. De esos pilares básicos que nunca deben faltar en un laboratorio. Por todo tu cariño durante estos años y siempre estar dispuesta a echarme una mano.

Maca pero qué voy a hacer contigo...? Pues darte las gracias por todos los buenos momentos dentro y fuera del lab. Compartiremos celda en el infierno por todos los ratoncitos muertos, pero al menos, ahí no pasarás frío jaja.

A mis peques, Mini Patri, Veronique, Antoñito, Lore y también a Mónica ,Mery y George. Por dar ese toque de alegría y llenar el lab de aire fresco y energía contagiosa. Patri y Vero os cedo el testigo, ahora os toca a vosotras disfrutar esta aventura y sé que lo haréis mil veces mejor que yo. Seguid siendo esas niñas sensatas y buena gente y llegareis muy lejos jovenzuelas.

Agradecimientos

A Elenita, nuestra chaparrita, por ese toque de color y positivismo frente a la vida. Gracias por haberme dejado aprender contigo.

A mis compis de poyata y viajes Mariano, Marta y Fran. Iniciamos el camino en el maravilloso mundo del redox y los microRNAs juntos y al fin recogemos parte de los frutos. Muchas gracias por sembrar conmigo chicos.

A Eva por todos los mojitos preparados con buen ritmo, ojalá nos tomemos uno algún día para celebrarlo.

Dear Rose Mery, mil gracias!! Gracias por hacer que la distancia no importe y que volver a verte sea como si nunca te marchases. Gracias por siempre estar dispuesta a ayudar y tener soluciones para todo. Gracias por las catas de cervezas y hamburguesas. Nos vemos al otro lado del charco. Te debo una cafetera.

Osquitar, no sé si he llegado a estar a la altura del testigo que me pasaste, pero lo he intentado. No se que decirte jaja. Gracias por compartir experiencias y experimentos durante estos años y hacer el día a día más llevadero y divertido, incluso de costa a costa, sobre todo este último año. Gracias por compartir escritura conmigo y los últimos momentos en el 103, ha sido un placer y un honor. Gracias a Noe y a ti por hacerme tia postiza.

A Patri una loca newyorkina que tiene energía para hacerse las americanas, cuidar de dos peques y más. Muchas gracias por tu apoyo y cariño siempre.

A Don José, quien me llamara ahora María Cristina... Muchas gracias por siempre tener ese toque de buen humor, ánimo y compañerismo y hacer del 427/103 un lugar mejor.

Si nos salimos ya de los muros del lab, los primeros que encuentro para agradecer son esos vecinos que siempre tienen un poquito de sal para dejar, un rato para un café y un montón de bromas para hacer desconectar. Gracias a los chicos del 426, Larita, Javi, Leo, María, Juanito y el resto, mil gracias por siempre echar un cable. A Martita otra vecina memorable de la cuarta planta, mil gracias.

A José mi camarero preferido, por ese café templado o con leche fría y caliente.

A las chicas del servicio de citometría Berta y Silvia, por su ayuda siempre con ese aparato del infierno.

Al servicio de Genómica, en concreto a Begoña Aguado y Ramón Peiro por su ayuda con la región promotora del micro.

A María Monsalve por todo el feedback que me ha dado en los seminarios durante estos años.

A Matilde Alique y Marta Ruiz Ortega por su colaboración y sus ánimos. También a M^a Luz Chantar por su ayuda y disposición en este trabajo.

A Carlos Sánchez Ferrer y Concha Peiro y a sus chicas Susana y Elena, gracias vuestra colaboración y apoyo siempre con la mejor de las sonrisas.

A Ángeles Navas por ofrecerme la primera oportunidad de trabajar y aprender lo que es trabajar de verdad en un laboratorio.

A Carlos Fernández Hernando y Yajaira Suárez, por acogerme en su laboratorio y enseñarme todo lo que debería saber sobre microRNAs. Gracias a toda la gente de su lab, en especial a Juanfra, Noe, Cris y Aran. A Alberto y Diana por compartir conmigo la experiencia.

Dear Terry, you were always kind and helpful with me. I will always be grateful. Thanks for the opportunity to know your laboratory and your family. Thanks to your entire lab, in special Stephanie, Megan, Claire and Diane.

A Almu por todos los sustos en cultis a deshoras.

A Ironman, vecino de lab y de pueblo, entrenador personal y compi de biblioteca a tiempo parcial. Te toca eres el siguiente. Suerte y mucho ánimo que este triatlón lo tienes hecho.

A mis chicas del consultorio 24 horas. Muchas gracias por vuestra *solidaridad* durante este tiempo. Sandri gracias por esas palabras de aliento y por compartir tu energía. Anita por las cervezas, los conciertos, los viajes en coche a grito pelao cantando y por los ratos en clase de guitarra.

A mis químicos. Sarita, Jacobín, Nachito, Josito. Porque empezamos esto juntos y lo acabaremos juntos. Por hacerme reír como una niña siempre y porque aunque el tiempo y la posición no siempre cuadren, estar siempre tan cerca.

Mis alcorconeras, Patri, Nat, Mery, Mar y Saldaña por el mundo porque pese a las subidas y bajadas siempre estáis ahí. Hermanas Sánchez gracias por acompañarme siempre en mis fricadas.

A mi Rubia, porque aunque tengamos agendas imposibles siempre sacamos un rato para ponernos al día y marujear como si no hubiera un mañana.

Mis seattleros Lau, Luci, Uri y Zairi, porque conoceros fue un placer y porque hicisteis del viaje una gran experiencia. Por los futuros reencuentros.

A mis señoras. Porque no hay mejor gente en el mundo ni más auténtica. Vero, márame camión!! Nunca dejarás de sorprenderme, gracias por tu humildad y tu ayuda incondicional siempre. Mi Mery Helen, mi Thelma! Gracias por tu locura, por las

Agradecimientos

aventuras vividas y por vivir, por compartir tanto con nosotras a pesar de la lejanía. Siempre nos quedará Gorda.

Mari Carmen, gracias por ser ejemplo de lo que todos deberíamos llegar a ser. Querida excompañera y sin embargo amiga. Gran compañera, gran amiga, ejemplo de lucha y de superación diaria. Gracias por tu ayuda cada día esté donde esté. Es verdad eso que dicen que las mejores esencias se encuentran en frasco pequeño.

A Carmencita, gracias por tu cariño durante estos años. Gracias mami Carmen por enseñarme a pipetear.

A Jose porque me animaste a seguir cuando ni yo misma creía en mí. Gracias por compartir conmigo estos años de aprendizaje.

A Dani, Mi Don Pelayo, gracias por la reconquista, por decidir compartir y emprender este camino conmigo pese a las dificultades con ganas y fuerza.

A Javi, Juanji , Olgui y Fátima por vuestro apoyo aunque me esté fundiendo la herencia (jajaaj). A mis sobrinos por ser la alegría de mi vida. Mariete, Adri y Rubén gracias por vuestra dulzura.

A mi tita Palomita, mis tíos y mis primos por estar ahí siempre.

Mama, Papa gracias porque sin vosotros nunca hubiera llegado a ninguna parte, gracias por estar ahí y demostrarme que da igual lo lejos que vuele, siempre tendré un nido donde volver a descansar y coger nuevo impulso.

Todo final es un nuevo principio, gracias por darme impulso.

Tabla de contenido

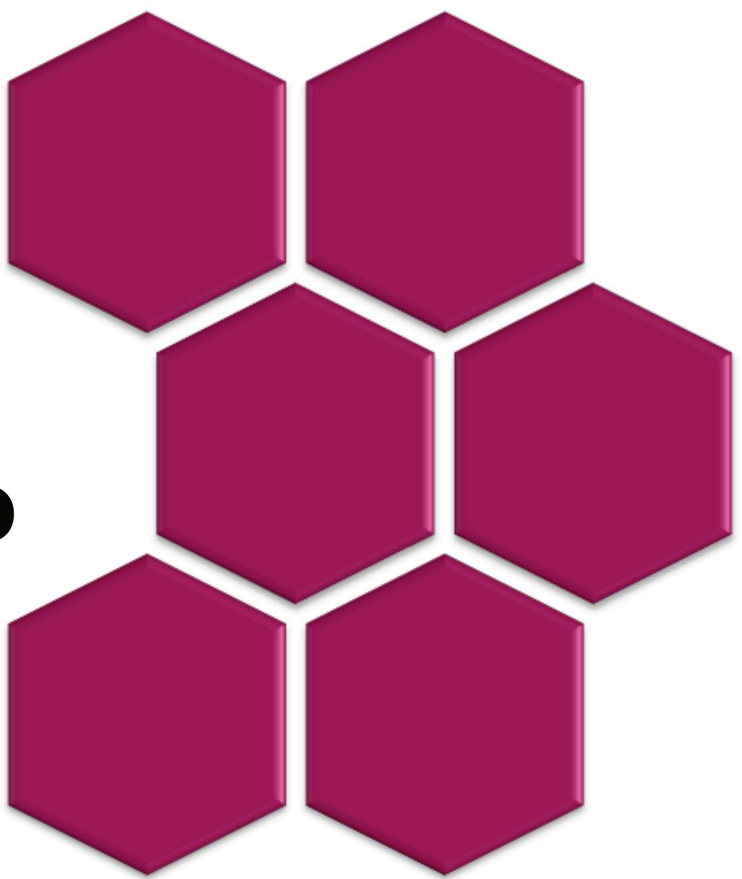


Tabla de contenido

Agradecimientos.....	9
Tabla de contenido.....	15
Lista de tablas	23
Lista de figuras	27
Abreviaturas	33
Summary	39
Introduction	41
Objectives.....	41
Results.....	42
Conclusions.....	44
1. Resumen	45
2. Introducción	51
2.1 Glutathión	53
2.1.1 Función antioxidante del GSH.....	53
2.1.2 Síntesis del GSH.....	54
2.2 γ -Glutamyl-cistein ligasa (GCL)	55
2.2.1 Regulación de GCL	56
2.2.1.1 Regulación transcripcional de GCLc.....	56
2.2.1.2 Fosforilación de GCLc	57
2.2.1.3 Corte proteolítico por caspasa	58
2.2.1.4 Regulación de GCLm	58
2.2.1.5 Polimorfismos en GCL.....	59
2.2.2 Implicación del GSH en la señalización redox	59
2.2.3 Modelos animales deficientes en GCL.....	61
2.3 Factor nuclear (derivado de eritrocitos 2)-2 (Nrf2).....	62
2.4 Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	65
2.4.1 NADPH oxidasas	67

Tabla de contenido

2.4.2 Mitocondria.....	67
2.4.3 Óxido nítrico sintasas (NOS).....	68
2.4.4 Xantina oxidasa (XOR)	69
2.5 Patologías en las que está implicado el estrés oxidativo.....	69
2.5.1 Disfunción endotelial	69
2.5.2 Fibrosis	69
2.5.2.1 Fibrosis renal	72
2.5.2.2 Fibrosis hepática	73
2.6 Los microRNAs	74
2.6.1 Organización genómica de los microRNAs.....	75
2.6.2 Biogénesis de los microRNAs	75
2.6.3 Procesado de los microRNAs en el núcleo: Drosha y Dgcr8	76
2.6.3.1 microRNAs intrónicos.....	76
2.6.4 Transporte del núcleo al citoplasma. Exportina-5.....	78
2.6.5 Dicer	78
2.6.6 Mecanismos de acción de los microRNAs.....	79
2.6.6.1 Las proteínas de la familia Argonauta	79
2.6.6.2 La subfamilia AGO	79
2.6.6.3 Corte del mRNA.....	80
2.6.6.4 Represión traduccional.....	80
2.6.6.5 Reconocimiento de la diana	80
2.6.9 Nomenclatura para denominar los microRNAs y sus variantes	81
2.6.10 Técnicas empleadas para la pérdida o ganancia de función de microRNAs	81
2.7 RedoximiRs	84
2.8 microRNAs en el endotelio	86
2.9 FibromiRs	86
2.10 miR-433.....	87
3. Objetivos	91
4. Materiales y métodos	95

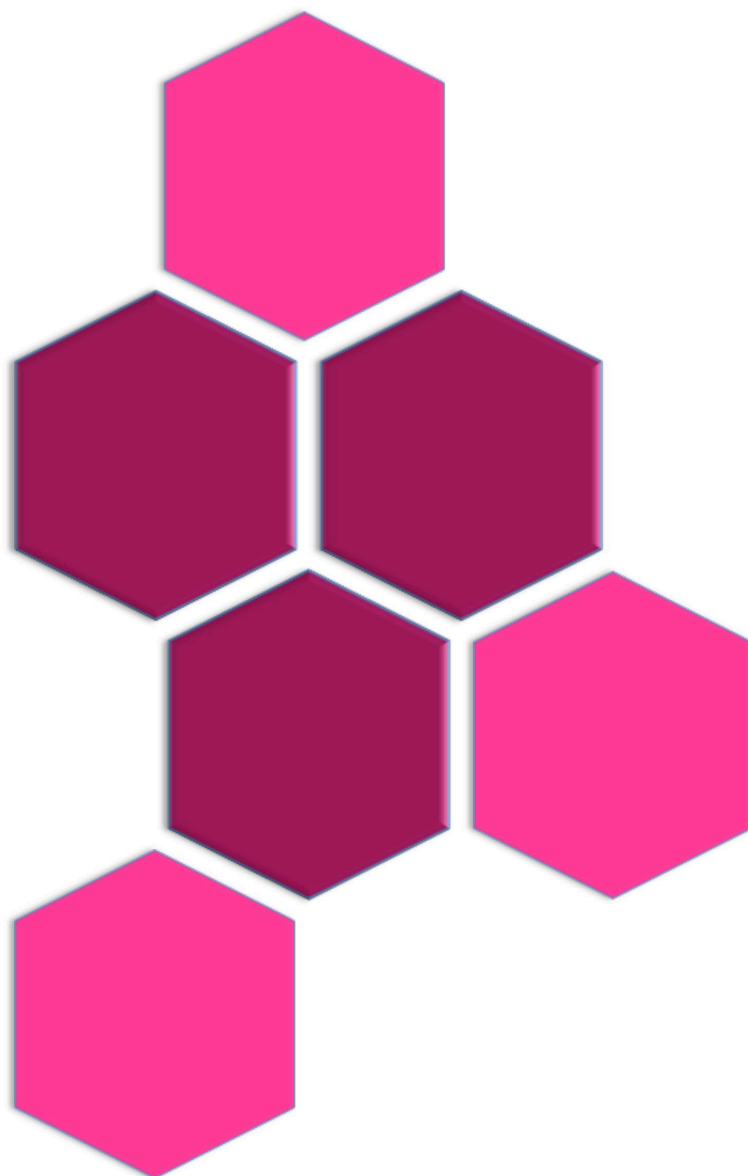
4.1 Células en cultivo	97
4.1.1 Cultivos primarios.....	97
4.1.2 Líneas celulares	98
4.2 Transfección transitoria con siRNA o microRNAs.....	98
4.2.1 Sobreexpresión con microRNAs sintéticos y transfección de inhibidores. 99	
4.2.2 Transfección RNA interferente (siRNA).....	99
4.3 Medidas de especies reactivas de oxígeno	100
4.4 Determinación de los niveles de GSH y GSSG	100
4.4.1 Medidas de GSH mediante luminiscencia	100
4.4.2 Medidas de GSH total mediante fluorimetría con NDA.....	101
4.4.3 Medidas de actividad de GCLc en HPLC	101
4.5 Medidas del ratio redox 2GSH/GSSG mediante infección con adenovirus roGFP2.	103
4.6 Análisis de proteína mediante western blot	104
4.6.1 Preparacion de lisados celulares.....	104
4.6.2 Electroforesis SDS-PAGE.....	105
4.6.3 Electrotransferencia.....	105
4.6.4 Revelado específico de proteínas	105
4.7 Ensayo de S-glutathionilación de proteínas.....	105
4.7.1 Inmunoprecipitación de eNOS-S-glutathionilada.....	106
4.8 Apoptosis	107
4.9 PCR cuantitativa a tiempo real.....	107
4.9.1 Aislamiento de RNA total y microRNA	107
4.9.2 Transcripción reversa	107
4.9.3 PCR a tiempo real	108
4.9.4 PCR de microRNAs	109
4.9.5 Análisis de resultados por el método $\Delta\Delta Ct$	110
4.10 Ensayos de actividad luciferasa con 3'-UTR.....	111

Tabla de contenido

4.10.1 Plásmido psiCHECK2 (Promega)	111
4.10.2 Clonaje de las construcciones de 3'-UTR en el vector psiCHECK2	111
4.10.3 Construcción de mutantes puntuales de los sitios de unión de microRNAs.	112
4.10.4 Ensayo de actividad luciferasa	113
4.11 Modelos animales.....	114
4.11.1 Ligadura del conducto biliar	114
4.11.2 Obstrucción unilateral del uréter	115
4.11.3 Reactividad vascular	115
4.12 Análisis estadístico	115
5.Resultados.....	117
5.1 Identificación y confirmación de miR-433 como miRNA candidato para la regulación de GCLc y GCLm	119
5.1.1 Análisis bioinformático	119
5.1.2 miR-433 disminuye los niveles de la expresión de proteína de GCLc y GCLm	124
5.1.3 miR-433 inhibe la síntesis de GSH y reduce el tono nucleófilo celular	127
5.2 Regulación inversa de GCL y miR-433 mediada por estímulos pro-oxidantes	133
5.2.1 Efecto de la depleción de GSH en células endoteliales.....	133
5.2.2 Efecto de peróxido de hidrógeno sobre la expresión de miR-433 en HUVEC	134
5.2.3 El estrés oxidativo asociado al daño hepático modula la expresión de GCL y miR-433.	135
5.2.4 Nrf2 como elemento esencial en la expresión de GCL y en la propia expresión de miR-433.	138
5.3 Regulación de miR-433 frente a distintos estímulos en diferentes modelos endoteliales	139
5.3.1 Efecto de miR-433 sobre la transducción de señales intracelulares	139
5.3.2 Efecto de 17- β -estradiol sobre la expresión de GCL en células endoteliales	141

5.3.3 Ensayo de actividad luciferasa con el 3'-UTR bovino de GCLc y agonistas de receptores de estrógenos	144
5.4 miR-433 regula la respuesta redox asociada a daño fibrótico.....	147
5.4.1 Fibrosis hepática	147
5.4.2 Fibrosis renal	149
5.5 Caracterización de los niveles de expresión de miR-433 en modelos de sobreexpresión o inhibición estable de GCL	153
5.5.1 La sobreexpresión de miR-433 en un modelo de hepatocitos murinos inhibe la síntesis de GSH.....	153
5.5.2 Efecto de la delección de la subunidad moduladora de GCL en ratón sobre la expresión de miR-433.....	155
5.6 Generación y caracterización del modelo murino de delección para GCLc específico de endotelio	157
5.6.1 Ratón GCLc f/f.....	157
5.6.2 Caracterización del ratón GCLc haploinsuficiente específico de endotelio.	158
5.6.3 Análisis de la reactividad vascular en baño de órganos.	161
6. Discusión.....	165
6.1 Análisis <i>in silico</i> de las regiones 3'-UTR de GCLc y GCLm	167
6.2 Regulación redox de miR-433.....	168
6.3 miR-433 y disfunción endotelial	170
6.4 Regulación de miR-433 por GSH.....	171
6.5 miR-433 y regulación transcripcional.....	171
6.6 La importancia del GSH en la disfunción endotelial	172
6.7 miR-433: el nexo entre TGF- β y la inhibición de la síntesis de GSH.....	173
6.8 Perspectivas	177
7. Conclusiones.....	179
8. Bibliografía.....	183
Anexo.....	213

Lista de tablas



Lista de tablas

Tabla 1: Principales especies reactivas de oxígeno.....	66
Tabla 2: Clasificación de microRNAs por nomenclatura.....	81
Tabla 3: Dianas validadas para miR-433.....	88
Tabla 4: Secuencias de siRNA utilizados	99
Tabla 5: Tampón TES/SB	101
Tabla 6: Tampón de reacción de GCLc	102
Tabla 7: Gradiente para el programa de análisis por HPLC.....	103
Tabla 8. Anticuerpos	106
Tabla 9: Protocolo para transcripción reversa	108
Tabla 10: Oligos para PCR.....	108
Tabla 11: Protocolo PCR.....	109
Tabla 12: Protocolo termociclador para transcripción reversa Taqman.	109
Tabla 13: Protocolo termociclador para transcripción reversa Exiqon	109
Tabla 14: Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los fragmentos 3'-UTRs	112
Tabla 15: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida.....	113
Tabla 16: Resultado de búsqueda de secuencias ARE en el promotor de miR-433	169

**Lista de
figuras**



Lista de figuras

Figura 1: Funciones antioxidantes del glutatión.....	54
Figura 2: Etapas de la síntesis del glutatión.....	55
Figura 3: Estructura del factor de transcripción Nrf2.....	62
Figura 4: Esquema del sistema Keap1/Nrf2.....	64
Figura 5: Producción de especies reactivas de oxígeno después de una reducción incompleta del oxígeno.....	65
Figura 6: Fuentes principales de ROS.....	67
Figura 7: Esquema de la progresión y regresión fibrótica.....	71
Figura 8: Gráfica comparativa entre el número de microRNAs secuenciados	74
Figura 9: Biogénesis de los microRNAs y mecanismo de silenciamiento génico en citosol.....	77
Figura 10: Diferentes herramientas para inhibir la expresión de microRNAs.....	84
Figura 11: RedoximiRs implicados en diferentes patologías relacionadas con estrés oxidativo.....	86
Figura 12: Esquema de los genes codificados en la región DLK1-Dio3.....	87
Figura 13: Método GSH-Glo.....	100
Figura 14: Ecuación del potencial de Nernst.....	104
Figura 15: PCR de microRNAs	110
Figura 16: Método de cálculo de expresión génica $\Delta\Delta Ct$	110
Figura 17: Mapa del plásmido psiCHECK2.....	111
Figura 18: Funcionamiento del ensayo luciferasa con el plásmido pSICHECK2 en presencia de un microRNA.....	114
Figura 19: Predicción <i>in silico</i> de los microRNAs reguladores para ambas subunidades de GCL	119
Figura 20: Esquema de los fragmentos de 3'-UTRs de los mRNA GCLc y GCL.....	121
Figura 21: miR-433 se une a la región 3'-UTR de GCLc.....	122
Figura 22: miR-433 se une a la región 3'-UTR de GCLm.....	122
Figura 23: Efecto de miR-433 sobre el 3'-UTR bovino de GCLc.....	123
Figura 24: miR-433 disminuye la expresión de ambas subunidades de GCL.....	124
Figura 25: La inhibición de miR-433 no altera los niveles de expresión de GCL.....	125
Figura 26: La inhibición de GCL mediada por miR-433 se mantiene después de la exposición a H_2O_2	125
Figura 27: Efecto de la sobreexpresión de distintos microRNAs en BAEC	126

Lista de figuras

Figura 28: miR-433 no regula los niveles de la proteína Nrf2	127
Figura 29: miR-433 inhibe la síntesis de GSH disminuyendo los niveles de su forma reducida.....	127
Figura 30: miR-433 modula el balance redox en el endotelio vascular hacia un estado más pro-oxidativo.....	128
Figura 31: miR-433 favorece la S-glutathionilación de eNOS.....	129
Figura 32: miR-433 rompe el equilibrio redox celular.	130
Figura 33: miR-433 aumenta la activación de caspasa-3.....	131
Figura 34: Efecto de miR-433 sobre la activación de eNOS.....	131
Figura 35: Efecto de L-BSO en células endoteliales	133
Figura 36: La depleción de GSH aumenta los niveles de GCL mientras que reprime los de miR-433	134
Figura 37: Regulación inversa de GCL y miR-433 mediada por estrés oxidativo.....	135
Figura 38: La exposición de células hepáticas a H ₂ O ₂ aumenta los niveles de GCL y disminuye los de miR-433.	135
Figura 39: La exposición de células hepáticas a LCA genera un aumento de estrés oxidativo que modula los niveles de GCL y miR-433.....	137
Figura 40: Nrf2 es necesario para la expresión de GCL y de miR-433.....	138
Figura 41: Efecto de miR-433 en la activación de la vía de Akt.....	140
Figura 42: Influencia de la inhibición de la expresión de miR-433 sobre la vía PI3K-Akt	140
Figura 43: Silenciamiento e inhibición de GCL sobre activación dependiente de VEGF	141
Figura 44: Efecto de los estrógenos sobre la expresión de GC.....	142
Figura 45 Efecto de 17-β-estradiol sobre la expresión génica de GCLc	143
Figura 46: El tratamiento con 17-β-estradiol reduce los niveles de GSH.	143
Figura 47: Efecto de estradiol sobre la expresión de GCLs, Nrf2 y miR-433 en células endoteliales humanas.....	144
Figura 48: Efecto de estrógenos sobre la región 3'-UTR de GCLc	145
Figura 49: La ligadura del conducto biliar reduce la expresión de GCL y aumenta la expresión de miR-433	148
Figura 50: Efecto de la citoquina profibrótica TGFβ1 sobre la expresión de GCL	148
Figura 51: La inhibición de miR-433 previene la reducción de la expresión de GCL dependiente de TGFβ1 y la inducción del fenotipo fibrótico en células de origen hepático	149

Figura 52: Caracterización de GCL en el modelo de fibrosis renal causado por UUO	150
Figura 53: Caracterización de la expression genica de GCL y marcadores fibróticos en el modelo de fibrosis renal UUO	150
Figura 54: Caracterización de marcadores de daño renal en el modelo de UUO.	151
Figura 55: La expresión renal de miR-433.	151
Figura 56: El antagonismo de miR-433 en un modelo celular renal previene la inhibición de la expresión de GCL.....	152
Figura 57: Efecto de miR-433 sobre los niveles de GCL en células de ratón.....	153
Figura 58: Niveles de GSH y actividad de GCL en presencia de miR-433	154
Figura 59: Expresión de miR-433 en presencia de exceso de GSH.....	155
Figura 60: Expresión de GCLc y GCLm en muestras hepáticas de ratones control y deficitarios en GCLm.....	155
Figura 61: Efecto de depleción de GCLm in vivo sobre los niveles de miR-433	156
Figura 62: Generación del ratón “floxeado”	158
Figura 63: Expresión proteica de GCL en células endoteliales y fibroblastos aislados de ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+).....	159
Figura 64: Efecto de la haploinsuficiencia de GCLc en MLEC sobre la activación de eNOS	159
Figura 65: Inhibición de la síntesis de GSH en células de microvasculatura procedentes de pulmones de ratones haploinsuficientes para GCLc	160
Figura 66: EL gráfico representa la media \pm SEM de los niveles de miR-433 cuantificados por qPCR en células endoteliales aisladas de ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+).	160
Figura 67: Ensayo de relajación vascular dependiente de endotelio con Ach.....	161
Figura 68: Relajación vascular independiente de endotelio con SNP.....	162
Figura 69: Ensayo de relajación vascular dependiente de endotelio con HB ₄	162
Figura 70: Ensayo de relajación vascular dependiente de endotelio con NAC	163
Figura 71: Esquema de la región promotora de miR-433	169
Figura 72:Modelo final.....	175

Abreviaturas



Abreviaturas

ACh = Acetilcolina
 ADMA = Dimetilarginina
 ARE = Elementos de respuesta antioxidante
 Arg = Arginina
 As³⁺ = Ión arseniato
 ATP = Adenosina trifosfato
 BAEC = Células endoteliales de aorta bovina
 BCA = Ensayo del ácido bicinconínico
 BDL = Ligadura del conducto biliar
 BIOGEE = Glutación etil-éster biotinilado
 BSA = Albúmina de suero bovino
 CAT = Catalasa
 ChIP = Inmunoprecipitación de cromatina
 CON = Contralateral
 Cul-3 = Culina-3
 Cys = Cisteína
 DAPI= 4',6-Diamidina-2-fenilidona
 DCF= 2'-7'-Diclorofluoresceína
 DMEM = Medio de Eagle modificado por Dulbecco
 ECGF = Factor de crecimiento endotelial
 ECM = Matriz extracelular
 EMT = Transición epitelio mesenquima
 eNOS = Óxido nítrico sintasa endotelial
 FACS = Selección celular por fluorescencia
 FAM = Flavina-adenina nucleótido
 FBS = Suero fetal bovino
 FMN = Flavin mononucleótido
 FN= Fibronectina
 GAPDH = Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa
 GCL = Glutamil-cistein ligasa
 GCLc = Glutamil-cistein ligasa catalítica
 GCLm = Glutamil-cistein ligasa reguladora

Abreviaturas

GRX = Glutarredoxina

GS = Glutación sintetasa

GSH =Glutación

GSNO = S-Nitrosoglutación

GSSG = Forma oxidada del glutación

H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno

HB₂ = Dihidropterina

HB₄ = Tetrahidrobiopterina

HBSS = Solución balanceada de Hank

HO-1 = Hemooxigenasa-1

HRP = Peroxidasa de rabano

Hsa= Homo Sapiens

HUVEC = Células endoteliales humanas de la vena umbilical

ICAM-1 = Molécula de adhesión intercelular 1

KCl = Cloruro potásico

KHS = Solución fisiológica Krebs-Henseleit

Kim-1 = Molécula de daño renal -1

L-BSO = L-butil-sulfoximina

miRNA = microRNA

MLEC = Células endoteliales de pulmón murino

Mmu = Mus musculus

MP = Mutación puntual

NAC = N-acetilcisteína

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato

NDA = Naftalencarboxialdehído

NEM = N-etil-maleimida

NEM = N-etilmorfolino

NFκB = Factor nuclear κB

Ngal1 = Lipocalina-gelatinasa asociada a neutrófilos

NO• = Óxido nítrico

NOX = NADPH oxidasa

Nrf2 = Factor nuclear (derivado de eritrocitos 2)- 2

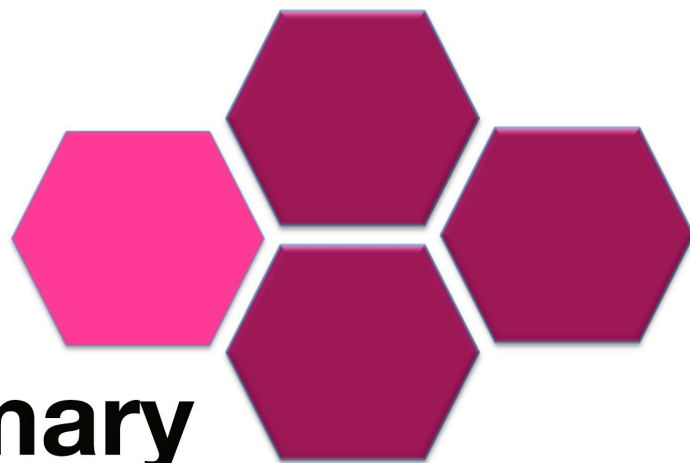
O₂-• = Anión superóxido

Opti-MEM = Medio esencial Optimo-Minimo

PBS = Tampón fosfato salino

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
PFA = Paraformaldehído
PRX = Peroxiredoxina
Ptr = Pan troglodytes
RISC = Complejo de silenciamiento inducido por RNA
Rno= Rattus Norvegicus
RNS = Especies reactivas de nitrógeno
ROS = Especies reactivas de oxígeno
Rpm = Revoluciones por minuto
SDS = Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE = Electroforesis en gel de poliacrilamida
SIN-1= 3-Morfolinosidnonimina
siRNA = Ácido ribonucleico interferente pequeño
SNP = Nitroprusiato sódico
SOD = Superóxido dismutasa
SSA = Ácido sulfosalicílico
TBS = Tampón Tris salino
TGF- β 1 = Factor de crecimiento transformante β 1
TRX = Tioredoxina
Tyr = Tirosina
UTR= Región no traducida
UUO = Obstrucción unilateral del uréter
VEGF = Factor de crecimiento endotelial vascular
WB = Western blot
WT = Silvestre
XOR = Xantina oxidoreductasa
 α SMA = Actina del músculo liso

Summary



Summary

Introduction

Glutathione is a tripeptide consisting of γ -glutamyl-cysteinyl-glycine (GSH) that is present in all cell types. GSH has great relevance due to its high concentration from 1-10 mM, with special relevance in the liver. It is present in the cellular environment, in its reduced form and also in its oxidized form (GSSG). The main function of GSH is as a detoxifying agent and a nucleophilic tone controller, and regulates the redox state of the cell, preferably by reacting with free radicals and electrophiles. The synthesis of GSH from its constituent amino acids requires two steps, both ATP-dependent. These involve the formation of gamma- glutamylcysteine from glutamate and cysteine and GSH by adding glycine to the gamma-glutamylcysteine. The first and limiting synthesis is catalysed by gamma-glutamyl cistein- ligase (GCL) and the second step mediated by GSH synthetase. γ -Glutamyl-cistein ligase is a heterodimeric enzyme composed by a heavy subunit, GCLc (73 kDa) with catalytic activity and a smaller one, GCLm (33 kDa) that has a regulatory role over the other.

The regulating of GCL expression occurs both at the transcriptional and post-transcriptional levels. Mainly, this regulation, on both subunits of the GCL, is performed by the Nrf2 transcription factor, which binds to the antioxidant response element (ARE) promoter present in the catalytic subunit and in the modifier one.

MicroRNAs are endogenous single chain small RNAs, about 22-26 nucleotides long. They were recently discovered as a novel mechanism of post-transcriptional regulation of gene expression. Numerous studies support that microRNAs expression changes may lead to development of diseases such as diabetes, cardiovascular damage and fibrosis. For GCL regulation mediated by microRNAs, there are very few references, which led us to consider this issue in order to identify specific microRNAs that regulate the expression of GCL and its importance in redox-state dependent pathologies.

Objectives

1. To study post-transcriptional regulation of the 3'-UTRs of both subunits of GCL by microRNAs and validate of the selected candidates.
2. To study the overexpression or inhibition of the selected candidate miRNA, miR-433 on a cellular physiology level.

Summary

3. To analyze the effects on the expression of miR-433 and GCL under pro-oxidants treatments, such as hydrogen peroxide, inhibition of GSH synthesis with L-BSO or inhibition of antioxidant response using a siRNA against Nrf2 transcription factor.
4. Regulation of miR-433 and GCL by estrogens as estradiol and GSK-4716 (estrogen agonist) in an endothelial model.
5. Characterization of miR-433 and GCL expression in renal and hepatic fibrosis using two types of approaches: unilateral ureteral obstruction (renal fibrosis) and bile duct ligation (hepatic fibrosis).
6. To study endogenous miR-433 levels in a mouse liver cell model that overexpressed catalytic and modifier subunits of GCL.
7. Analysis of miR-433 in liver tissue from GCLM knockout mice.
8. Generation and characterization of specific GCLc endothelial mouse model, as a tool for studying the effect of the deletion of the enzyme in endothelial dysfunction and damage.

Results

The *In silico* analysis of the 3'-UTR of human genes GCLc and GCLm on different databases as targetscan.org or miRwalk.org microRNAs provided us a list of microRNA candidates that have complementary binding sites for these sequences. Among these candidates we chose miR-433. This microRNA has not been previously studied in pathologies associated with oxidative stress, and contains two binding sites in each 3'-UTR of each GCL subunit. Thus, our studies focused on the regulation of miR-433 over GCL.

Overexpression of miR-433 was studied in different cell types: human, bovine and murine. In all of them a significant decrease in both subunits of GCL was observed, suggesting that the mechanism of regulation of miR-433 is conserved among different mammalian species. In human umbilical vein endothelial cells model (HUVEC), we also observed a decrease in protein levels and mRNA. We observed that this transient transfection with miR-433 was able to inhibit GCLm and GCLc increase, in response to hydrogen peroxide, without the involvement of the transcription factor Nrf2. In addition, miR-433 was able to decrease reduced GSH levels, generating an imbalance in the redox ratio 2GSH/GSSG, triggering an increase in protein S-glutathionylation.

Preliminary studies also indicate that miR-433 could be modulating the redox response signaling, modifying Akt, GSK3 and eNOS phosphorylation in response to stimuli such as VEGF and H₂O₂.

To evaluate the effect on GSH depletion in miR-433 levels we use the GSH synthesis inhibitor, L-BSO, which is able to inhibit GCLc function, but it also increase its mRNA levels. L-BSO decreased miR-433, which is also observed when cellular stress generated by other methods such as hydrogen peroxide or Nrf2 silencing, that

generate ROS and reduce GSH. This effect was not only observed in endothelial cells, we also observed similar results in hepatic cells where GSH is also highly relevant. A similar effect was observed with hydrogen peroxide and lithocholic acid in Huh7 human hepatoma cells *in vitro*, where a significant increase in the levels of GCLc and GCLm mRNA, was accompanied by a decrease of miR-433.

We also studied the effect of estradiol and estrogen receptor agonists. It had been described that estrogens may regulate miR-433 expression, binding to its promoter. In human and bovine endothelial cells GCLc mRNA and protein levels decreased and we also observed a decrease in GSH production in a concentration dependent manner. However, the fact that miR-433 was also decreased did not support an active role in this same effect.

In the field of pathological models, we analyzed renal fibrosis and liver fibrosis, since these diseases are accompanied by glutathione depletion. We realized that both GCLc and GCLm are significantly downregulated in both models, while miR-433 increases significantly after the damage that triggers the disease. Moreover in *in vitro* experiments in liver cells and kidney cells, TGF β 1 treatment induced a decrease in both subunits of the enzyme, which could be reversed using an inhibitor of miR-433. The miR-433 inhibition was also able to reverse α SMA increased expression, assigning a potential role to this microRNA as a modulator of fibrotic pathology.

In the murine GCLm deletion model, we measured GCLc, GCLm and miR-433 levels in liver samples. GCLM in this model is not present, but GCLc levels are duplicated trying to compensate this absence. GSH is virtually nonexistent in the cell. In these mice the levels of miR-433 were analyzed and interestingly we also saw a significant changes between control mice group and knockout mice.

To complete this analysis we generated on *in* endothelial GCLc haploninsufficiency mice. Preliminary results obtained studies with this mouse model show that GCLc haploninsufficiency mice displayed a decrease in endothelial-dependent relaxation compare to control mice. In this Thesis we show the on going work is directed to characterize the phenotype of this mouse, analyze the relevance of GSH in the endothelium and how could GCLc deficiency affect the signaling in other pathologies.

Conclusions

1. miR-433 is the first microRNA that targets both subunits of GCL which acts in an Nrf2-independent manner, inhibiting GSH biosynthesis in different cell models.
2. Overexpression of miR-433 in endothelial cells induces an oxidative stress increase and results in decreased eNOS activation and promotes post-translational modifications in the endothelium-dependent as S-glutathionylation and tyrosine nitration.
3. miR-433 is regulated by the redox state and is a redoximiR whose expression is reduced by oxidative damage like GSH depletion or treatment with pro-oxidant molecules.
4. Although miR-433 does not affect Nrf2 regulation, the presence of this transcription factor itself is key to miR-433 expression.
5. TGF- β -1- dependent miR-433 increase in different pro-fibrotic models (bile duct ligation and unilateral ureter ligation) causes GCLm and GCLc inhibition with a decrease in GSH synthesis. This effect is reversed by the miR-433 inhibitor.
6. miR-433 is a microRNA with a different regulation depending on the prevalence of the stimulus to which it is exposed, which may be inhibited in redox homeostasis collaborating in the antioxidant response or overexpressed by TGF β signaling.
7. GCLC subunit is critical for endothelial function and as such it is revealed in the specifically endothelial haploinsufficiency mouse model.

Resumen



1. Resumen

El glutatión es un tripéptido formado por γ -glutamil-cisteinil-glicina (GSH) que se encuentra presente en todos los tipos celulares. Tiene una gran relevancia debido a su alta concentración celular entre 1-10 mM. Se encuentra presente en el entorno celular tanto en su forma reducida como en su forma oxidada (GSSG). Su función principal es como agente detoxificante y como regulador del tono nucleofílico, y por tanto del estado redox de la célula, reaccionando de modo preferente con compuestos electrófilos y radicales libres.

La síntesis del GSH desde sus aminoácidos constitutivos requiere dos etapas dependientes de ATP. La primera etapa, limitante de la síntesis está catalizada por la gamma-glutamyl-cysteinyl-ligase (GCL) y el segundo paso mediado por la GSH sintetasa. La gamma-glutamyl-cysteinyl ligase es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad pesada de 73 kDa, que tiene actividad catalítica y una más pequeña de 33 kDa que tiene una acción reguladora sobre la otra. La regulación de la expresión de GCL se da tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. La mayor parte de la regulación sobre ambas subunidades de GCL la lleva a cabo el factor de transcripción Nrf2, que se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) presentes tanto en el promotor de la subunidad catalítica como el de la moduladora.

Los microRNAs son RNAs pequeños endógenos de cadena sencilla, de unos 22-26 nucleótidos de largo, y fueron recientemente descubiertos como un novedoso mecanismo de regulación post-transcripcional de la expresión génica. En el caso de GCL existe muy pocas referencias sobre regulación mediada por microRNAs, lo que nos llevó a plantearnos esta cuestión con el fin de identificar microRNAs específicos que regularan la expresión de GCL y conocer su importancia en patologías dependientes del estado redox.

El análisis in silico de los 3'-UTR de los genes humanos de GCLc y GCLm sobre distintas bases de datos como targetscan.org o miRwalk.org proporcionó una lista de microRNAs candidatos que tienen sitios de unión complementaria a estas secuencias. Entre todos estos candidatos se seleccionó miR-433. Este microRNA no ha sido estudiado previamente en patologías relacionadas con estrés oxidativo, y contiene dos sitios de unión en cada uno de los 3'-UTR de cada subunidad de GCL. Por ello nuestros estudios se enfocaron en la posible regulación de miR-433 sobre GCL. La sobreexpresión de miR-433 se estudió en distintos tipos celulares: humano, bovino y

murino. En todos ellos se observó una disminución significativa de ambas subunidades de GCL, lo que sugiere que el mecanismo de regulación de miR-433 está conservado entre diferentes especies de mamífero. En el modelo endotelial humano de células de la vena de cordón umbilical HUVEC, se observó que la transfección transitoria de este microRNA era capaz de inhibir el aumento de GCLc y GCLm en respuesta a peróxido de hidrógeno, sin el concurso del factor de transcripción Nrf2. Además, miR-433 es capaz de disminuir los niveles de GSH reducido y generar un desequilibrio en el ratio redox 2GSH/GSSG favoreciendo el aumento en la S-glutathionilación de proteínas. Estudios preliminares también indican que miR-433 podría estar modulando la respuesta redox a nivel de señalización, modificando la fosforilación de enzimas como eNOS y GSK3 en respuesta a estímulos como VEGF y H₂O₂.

Para evaluar el efecto de la propia depleción de GSH sobre los niveles de miR-433 utilizamos el inhibidor químico L-BSO, que es capaz de inhibir GCLc, pero sin embargo aumenta los niveles de mRNA. El efecto del L-BSO sobre miR-433 fue de una disminución significativa, que también se observa cuando generamos estrés celular mediante otros métodos. Este efecto no es exclusivo del modelo endotelial sino que fue también observado en un modelo hepático donde el GSH tiene también gran relevancia.

También estudiamos el efecto de estradiol y agonistas de receptores de estrógenos, ya que había sido descrito que estos podrían regular la expresión de miR-433 a nivel de promotor. En células endoteliales humanas y bovinas GCLc disminuyó tanto en proteína como en mRNA. Sin embargo, el hecho de que miR-433 también disminuyera no apoyaba un papel activo del mismo en este efecto.

Analizamos un modelo de fibrosis renal y otro hepático, ya que estas patologías cursan con depleción de glutatión. Observamos que tanto GCLc y GCLm se ven alteradas en ambos modelos, mientras que miR-433 aumenta significativamente tras el daño. Además, en experimentos in vitro realizados tanto en células hepáticas como renales, el tratamiento con TGFβ1 indujo una disminución de ambas subunidades de la enzima, que pudo ser revertida usando un inhibidor del microRNA, asignando un papel potencialmente relevante a este microRNA como modulador de la patología fibrótica.

En el modelo murino de delección de GCLm, se pudieron medir los niveles de GCLc y GCLm en muestras hepáticas. En este modelo GCLm no se encuentra presente y el glutatión es prácticamente inexistente en la célula. En estos ratones se analizaron los

niveles de miR-433 y curiosamente se observó también que existía una diferencia al alza entre el grupo de ratones control y el de ratones delecionados.

Para completar esta serie de resultados se está trabajando en la generación de un ratón GCLc delecionado de forma específica en el endotelio. Estudios preliminares con este ratón muestran, que los ratones heterocigotos haploinsuficientes para GCLc exhiben una relajación dependiente de endotelio alterada respecto a los ratones control. Se están realizando experimentos para caracterizar el fenotipo de este ratón, y completar el estudio sobre la relevancia de la disminución de GCLc y de glutatión en el endotelio y cómo puede ello afectar al resto de los órganos.

Introducción



2. Introducción

2.1 Glutación

El glutatión es un tri-péptido formado por γ -glutamil-cisteinil-glicina (GSH) que se encuentra presente en todos los tipos celulares. Su elevada concentración intracelular (1-10 mM), con especial importancia en el hígado, le confiere una gran relevancia funcional como antioxidante endógeno. Se encuentra presente tanto en su forma reducida como en su forma oxidada (GSSG). El GSH se distribuye en las células principalmente en el citoplasma, alrededor de un 10% en la mitocondria y en el retículo endoplásmico [1] [2], pero también ha sido reportada su presencia en el núcleo [3] y en peroxisomas [4]. Esta distribución intracelular tiene un gran significado en su función protectora frente al estrés oxidativo y los radicales libres, ya que estas moléculas tienen una corta vida media y ejercen su acción cerca del lugar donde son generadas [5]. La función principal del GSH es la de regulador del estado redox de la célula ya que actúa como agente detoxificante de compuestos electrófilos y radicales libres y regulador del tono nucleofílico.

La estructura del GSH es única debido a su enlace peptídico, que une el ácido glutámico con la cisteína por el grupo γ -carboxilo, en lugar de por el grupo α -carboxilo. Este tipo de enlace hace que el GSH sea muy resistente a degradación, siendo la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT), la única enzima capaz de romperlo [6]. Esta enzima sólo se encuentra en la superficie externa de algunos tipos celulares [7]. Ello permite que el GSH liberado al espacio extracelular, se descomponga en sus aminoácidos y estos se reincorporen a la célula para que el GSH sea sintetizado de nuevo [8, 9].

2.1.1 Función antioxidante del GSH

El desequilibrio que se da entre ROS y la capacidad de la célula para generar una respuesta antioxidante efectiva es uno de los componentes del estrés oxidativo y el GSH tiene aquí su papel fundamental [10]. La función antioxidante del GSH está acoplada a la reacción enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) que reduce peróxido de hidrógeno y lípidos peroxidados, mientras que oxida el GSH a glutatión oxidado (GSSG). El GSH se recupera mediante la acción de la glutatión reductasa (GR) con coste de una molécula de NADPH, cerrando así el ciclo redox [6, 9]. Ello dota al GSH de un papel particularmente importante en la mitocondria para reducir el

Introducción

estrés tanto fisiológico como patológico [11, 12]. Otro mecanismo de protección que la célula usa para evitar una alteración brusca cuando aumenta el estrés oxidativo, es transformar el GSSG reduciéndolo a GSH, pero además puede expulsarlo de forma activa o hacerlo reaccionar con grupos sulfhidrilo de proteínas, generando disulfuros mixtos (Figura 1). A pesar de estos mecanismos moduladores que promueven el mantenimiento del equilibrio en los niveles de GSH, un severo estrés es capaz de agotar los niveles intracelulares de GSH [9].

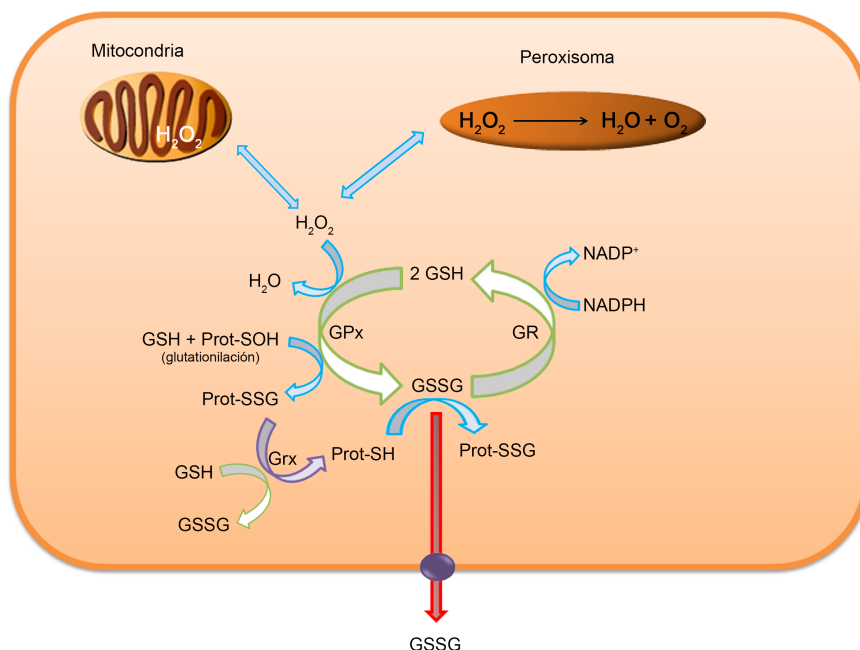


Figura 1: Funciones antioxidantes del glutatión. La respiración aeróbica puede producir H_2O_2 , metabolizado por la GPx generando GSSG en el citosol o en el peroxisoma por acción de la catalasa. El GSSG puede reducirse de nuevo por acción de la GR, formando así un ciclo redox. Además el GSH puede capacidad de formar disulfuros mixtos mediante S-glutationilación, generándose un mecanismo de protección de residuos sensibles a la oxidación. Por último para prevenir un desbalance en el estado redox, el GSSG puede ser transportado fuera de la célula.

2.1.2 Síntesis del GSH

La síntesis del GSH desde sus aminoácidos constitutivos requiere dos etapas dependientes de ATP. La primera de ellas es la formación de γ -glutamil-cisteína a partir de glutamato y cisteína y la segunda la formación de GSH por incorporación de glicina a la γ -glutamil cisteína (Figura 2).

La primera etapa, limitante a su vez de la biosíntesis del glutatión, está catalizada por la gamma-glutamyl-cistein ligasa (GCL) y el segundo paso mediado por la GSH sintetasa (GS). Aunque este paso no es limitante de la síntesis, algunos autores han sugerido que bajo condiciones de estrés, puede convertirse en un paso crítico [6, 9].

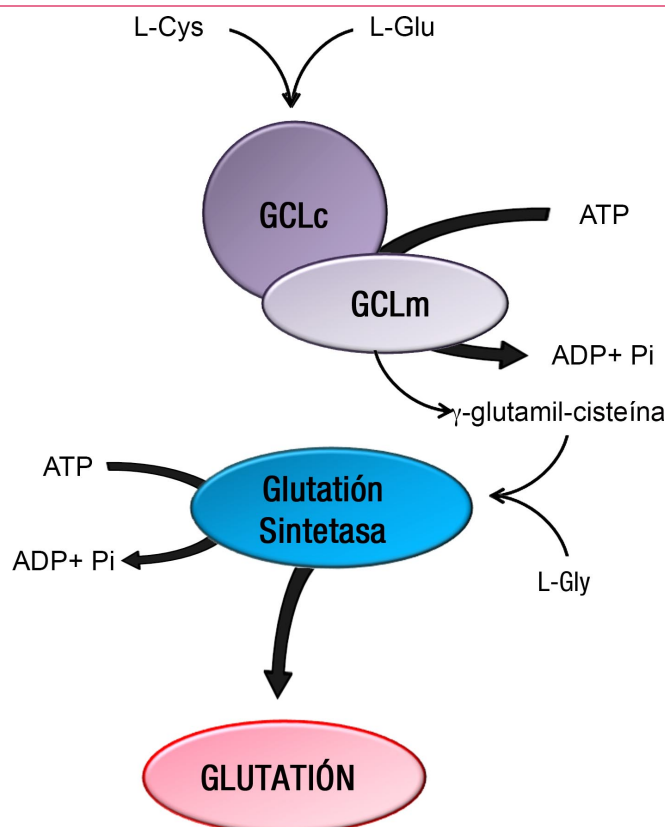


Figura 2: Etapas de la síntesis del glutatión. La síntesis del GSH ocurre en dos etapas dependientes de ATP. La primera etapa y la limitante está catalizada por GCL, compuesta por dos subunidades GCLc y GCLm. Este paso conjuga la cisteína con el glutamato mediante un enlace γ -carboxílico formándose la γ -glutamyl-cisteína. El segundo paso lo lleva a cabo la GS encargada de añadir la glicina para formar el tripeptido γ -glutamylcisteinilglicina (GSH).

2.2 γ -Glutamyl-cistein ligasa (GCL)

La etapa limitante de la síntesis del GSH es la que lleva a cabo la enzima GCL (EC6.3.2.2), más conocida como γ -glutamyl-cistein ligasa o γ -glutamyl-cistein sintetasa. Es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad pesada de 73 kDa (GCLc), que tiene actividad catalítica y una más pequeña de 33 kDa (GCLm) que tiene una acción reguladora sobre la otra. Estas subunidades están codificadas por genes distintos en algunas especies como mosca, roedores y humanos, mientras que en levaduras y bacterias se encuentran codificadas por un único gen que genera un único polipéptido [13] [14] [15].

La GCLc, en su forma aislada conserva toda la actividad catalítica de la enzima y es susceptible de inhibición por GSH. Sin embargo aunque la GCLm carezca de actividad tiene un papel fundamental en la regulación de la subunidad catalítica [6, 9, 16]. Esto ocurre porque GCLm es capaz de reducir la constante de afinidad (K_m) de GCLc por el glutamato, mientras que aumenta la constante de inhibición (K_i) del GSH por ésta. Esto hace que la holoenzima sea catalíticamente más eficiente y menos

sensible a inhibición por producto final [6, 9, 13, 17]. Los ratones deficientes en GCLm son viables, dado que esta enzima parece no ser esencial, aunque sí presentan una drástica reducción en los niveles de GSH de hasta casi un 90% [18].

La formación de la holoenzima está regulada por estrés, viéndose aumentada en condiciones de daño oxidativo aunque no exista ningún cambio en la expresión de ambas enzimas [19].

2.2.1 Regulación de GCL

Bajo condiciones fisiológicas GCL está regulada por: a) GSH mediante inhibición competitiva y no alostérica ($K_i = 2,3 \text{ mM}$) y b) disponibilidad de uno de sus sustratos, la L-cisteína. La concentración del otro sustrato, el L-glutamato en la célula no es limitante ya que su concentración en la célula es 10 veces superior a la K_m de la enzima [9] [20].

Se han descrito también cambios en la actividad de esta enzima, dependiendo de la regulación a distintos niveles sobre cada una de sus subunidades GCLc, GCLm o de ambas.

2.2.1.1 Regulación transcripcional de GCLc

Muchos tratamientos, fármacos o condiciones han sido descritos como reguladores de GCLc. El propio estrés oxidativo está asociado a un aumento de los niveles de GSH, de la actividad de GCL y de su expresión tanto a nivel de proteína como de mRNA. La mayoría de estos factores actúan regulando ambas subunidades [6, 9], incluso se han descrito tratamientos capaces de inducir ambas subunidades de la GCL y que también afectan a la expresión de la GS [21] [22] [23].

Sin embargo existen algunos ejemplos y modelos experimentales donde sólo GCLc se regula de manera transcripcional. Uno de ellos es un modelo de hepatocitos de rata tratados con insulina o hidrocortisona donde sólo se observa un aumento transcripcional de GCLc [24].

Otra ejemplo en el cual los niveles de GCLm no se ven alterados, mientras que los de GCLc están claramente aumentados, es cuando se produce un crecimiento rápido del hígado, observado *in vitro* con hepatocitos sembrados en subconfluencia e *in vivo* mediante hepatectomías parciales [21, 25]. Estos efectos son similares a los observados en carcinoma hepatocelular [21].

El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1), una citoquina de acciones pleiotrópicas implicada en la patogénesis de distintos tipos de fibrosis, fue descrito

también como un factor que regulaba los niveles de GSH a partir de la modulación de GCLc, aunque existen controversias al respecto y se profundizará más adelante en el apartado dedicado a los cambios de GSH y GCL en fibrogénesis (2.5.2 Fibrosis) [26, 27].

Los tratamientos antioxidantes junto con otros como zinc, productos de peroxidación lipídica, choque térmico o los inductores de enzimas detoxificantes de fase II (enzimas que mediante reacciones de conjugación facilitan la eliminación de tóxicos de la célula) tienen influencia sobre la regulación transcripcional de GCLc [9, 28]. En conjunto puede afirmarse que GCL aumenta cuando la defensa celular es necesaria. Sin embargo, cuando el daño persiste GCL puede estar alterada. Por ejemplo en hepatocitos tratados con ácido litocólico, se produce un aumento inicial de los niveles de GCL, pero después esta regulación se suprime [29]. Un efecto similar ocurre en el modelo de fibrosis producida por ligadura del conducto biliar [29], del que se hablará en el apartado (2.5.2.2 Fibrosis hepática).

Tanto el promotor humano como murino de GCLc tienen elementos reguladores comunes. Aparecen secuencias consenso para NF κ B, AP1, AP2, elementos de respuesta a metales MRE, elementos de respuesta a electrófilos y antioxidantes ARE/EpRE, sitios consenso de unión a c-myc [30-33] [34, 35]. El sitio AP-1 es esencial para la respuesta a estrés [36, 37]. El sitio ARE es fundamental para la expresión constitutiva y también para respuesta a antioxidantes [31]. Sin embargo este sitio ARE-4 ha sido descrito en células alveolares, como el sitio de acción para TGF- β 1, donde se uniría Fra-1/c-Jun bloqueando la regulación transcripcional [26]. Estos sitios ARE son esenciales ya que son los sitios de respuesta para el factor de transcripción Nrf2. Existen otros estímulos independientes de Nrf2 como por ejemplo el desencadenado por el ión arseniato (As^{3+}) [38]. Nrf2 es el factor de transcripción clave en el aumento de la expresión de GCL y más adelante se profundizará en sus características y en su vía de activación (2.3 Factor nuclear (derivado de eritrocitos 2)-2 (Nrf2)) [39].

2.2.1.2 Fosforilación de GCLc

La síntesis de γ -GC necesita de la fosforilación del L-glutamato por GCL, generándose así un compuesto intermedio activo γ -glutamil-fosfato. Este mismo proceso ocurre también con la L-butionin-sulfoximina (L-BSO), en este caso la formación de este compuesto intermedio fosforilado es la causante de la inhibición que se genera por el L-BSO, ya que se queda anclado al sitio activo [40, 41]. Sin

embargo se ha observado que GCLc es capaz de autofosforilarse [42]. Esta autofosforilación que se puede dar en serina o treoninas disminuye la velocidad máxima de la reacción de formación de γ -GC, pero sin aumentar la K_m para el glutamato. El sitio de fosforilación aún no ha sido descrito [28].

Además de esta “autofosforilación”, las primeras evidencias de que la fosforilación tiene un papel importante tienen que ver con el hecho de que ciertas hormonas que regulan quinasas como PKC, PKS y calcio calmodulina quinasa (PKC, PKA o CMKII) inhiben la actividad GCL en hepatocitos de rata [43]. Estudios *in vitro* confirman que estas enzimas pueden fosforilar GCL de forma directa [44]. Esta fosforilación, al igual que ocurre con la autofosforilación, tampoco causa disociación de la holoenzima en sus monómeros, lo que sugiere que existe otro mecanismo que determina la supresión de la actividad, pero sin alterar la estructura del holoenzima [28]. El grado de fosforilación de GCL se correlaciona con el de inhibición, pero con una modesta reducción en la actividad [45] [28].

2.2.1.3 Corte proteolítico por caspasa

En muchos modelos de muerte celular por apoptosis, los niveles de GSH se ven rápidamente reducidos [46, 47]. Este fenómeno se asocia a una disminución de la síntesis y degradación de GCLc, aunque la depleción de GSH es independiente del corte proteolítico por caspasas sobre GCLc. Algunos transportadores como los que pertenecen a la familia de los de resistencia a drogas ABCC/MRP o los transportadores de aniones orgánicos (SLCO/OATP) son los responsables de la pérdida de GSH en la célula durante la muerte celular [48] .

La escisión de GCLc genera dos fragmentos, uno de 60 y otro de 13 kDa. El sitio de corte es Asp499 cercano a la Cys553, que tiene un papel fundamental en la formación de puentes disulfuro con la subunidad reguladora GCLm. Sin embargo, en contra de lo esperado, la escisión de GCLc no reduce la actividad enzimática durante la muerte celular, ya que los fragmentos de 60 y 13 kDa permanecen unidos después del corte [47]. El fragmento de 13 kDa que queda expuesto tiene una glicina en el fragmento N terminal, susceptible de ser miristoilada. Esta miristoilación ha sido demostrada cuando este fragmento fue sobreexpresado, sin embargo no es tan clara en células en las cuales se induce muerte celular [28, 47].

2.2.1.4 Regulación de GCLm

La subunidad reguladora de GCL juega un papel crítico en la síntesis de GSH. Normalmente las dos subunidades del enzima están perfectamente coordinadas para

inducirse por estrés oxidativo o tras exposición a xenobióticos debido a la activación del factor de transcripción Nrf2 [13, 17]. En el análisis del promotor de *GCLm* se encontraron sitios ARE/EpRE y también un sitio de unión a c-myc, necesario para una completa inducción frente a estímulos como peróxido de hidrógeno [49-51]. Este promotor al igual que el de *GCLc* está altamente conservado en humano y en roedor. No todos los inductores de estrés oxidativo inducen la expresión de GCL, por ejemplo el etanol y el TGF- β 1 no inducen cambios de *GCLm* en rata, pero la razón de que en este modelo puntual no se observen cambios no es obvia [52] [53]. De modo similar a la *GCLc*, la *GCLm* sufre una respuesta bifásica tras exposición a BDL y ácido litocólico [29, 54].

2.2.1.5 Polimorfismos en GCL

A lo largo del tiempo en los estudios sobre la GCL en humanos se ha observado una gran variabilidad con respecto a la inducción de su expresión. Esta variabilidad entre individuos se debe a la existencia de distintos polimorfismos que afectan a la secuencia de aminoácidos de las dos subunidades. Muchos de estos cambios o polimorfismos causan una disminución de la expresión y de la actividad del enzima, y el fenotipo de la enfermedad puede ser bastante severo [28]. Uno de los polimorfismos más comunes es la repetición del trinucleótido CAG en la región 5'-UTR del mRNA de *GCLc*, siendo el número de repeticiones lo que se correlaciona con la función pulmonar en la patología de la fibrosis quística [55]. Otros estudios demuestran que ciertos polimorfismos en los promotores de ambas subunidades están asociados con riesgo de daño cardiovascular [56] [57] [58] .

2.2.2 Implicación del GSH en la señalización redox

El par redox 2GSH/GSSG es capaz de interferir en la señalización celular modificando el estado de oxidación de cisteínas presentes en proteínas críticas en la célula, como por ejemplo factores de transcripción y otros señalizadores. Un desequilibrio en los niveles de este par redox produce la unión del GSSG al de forma reversible a grupos tiol de las cisteína formando complejos Proteína-SSG, por un mecanismo denominado S-glutathionilación. Este mecanismo puede activar o inactivar la proteína y a su vez ser un mecanismo de protección de grupos tioles frente a otros tipos de oxidación irreversible [5, 59].

La S-glutathionilación modula la mayoría de las vías celulares, incluso interfiere en los mecanismos de fosforilación, ya que modula distintos tipos de quinasas. La

concentración de los grupos sulfhidrilo como residuos de proteínas en las células es mayor que los niveles del propio GSH. Pueden estar presentes como tioles libres (-SH), como tiolatos (PS^-), oxidados como grupos sulfénicos (PSOH), sulfinico (PSO_2H) y grupos sulfónico (PSO_3H). Además pueden encontrarse como puentes disulfuro entre proteínas (PSSP) o disulfuros mixtos con cisteínas libres (cisteinilación, PSSC) o unidas a GSH (glutathionilación, PSSG). La mayoría de estas modificaciones son inestables y pueden fácilmente revertirse ya que tienen una constante de acidez $\text{pK}_a \geq 8$ y debido a las condiciones reductoras del entorno celular permanecen protonadas y no son sensibles a la oxidación [5]. El mecanismo propuesto para entender la reactividad de tioles sensibles a redox implica su localización en bolsillos o regiones básicas donde serían más reactivos. En algunos trabajos se ha propuesto que esta S-glutathionilación no sólo es un mecanismo de protección celular frente a estados patológicos de estrés, sino que se puede dar también en condiciones fisiológicas.

La reversibilidad de este proceso también es un mecanismo interesante, como elemento regulador. Puede ocurrir de una forma directa por uniones tiol/disulfuro, reacciones de intercambio con GSH, la restauración del ratio $2\text{GSH}/\text{GSSG}$ o la intervención de la enzima glutarredoxina.

La S-glutathionilación es capaz de regular y modular diferentes vías. Esta modificación es capaz de controlar incluso la expresión génica afectando a distintos factores de transcripción como por ejemplo la estabilización de Nrf2, impidiendo que se una a Keap1 ya que éste se glutathionila [60, 61]. Otra vía de señalización que se modula es la de NF κ B, ya que muchos miembros de esta vía (Akt, IKK, p65, etc...) se inhiben por este mecanismo [62]. También modula la señalización celular modificando quinasas como la PKA [63] creatinina quinasa o la MEKK1 [64] [65], o fosfatasa como PTEN o PP2A [66, 67]. Así mismo, algunos canales de calcio como el del receptor de rianodina son susceptibles de ser glutathionilados, en este caso aumentando su función [68].

Además de estos canales, otras proteínas dependientes de calcio también pueden ser reguladas por este tipo de modificación. Una de las más interesantes en el campo del estrés oxidativo y de la disfunción endotelial es la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). En este caso la S-glutathionilación de eNOS ha sido descrita como inhibitoria y aumenta la producción de anión superóxido. El mecanismo de desacoplamiento de eNOS debido a esta modificación afecta a las cisteínas Cys689 y Cys908, que se encuentran en la interfaz de los dominios de unión a las flavinas FAD y FMN

respectivamente. La modificación de estos residuos impide el alineamiento y transferencia electrónica, facilitando a su vez el acceso al O_2 , que se oxida a O_2^- [69]. También se ha observado que pueden ser afectados por esta modificación post-traducciona, el ciclo de Krebs, las vías de muerte y supervivencia celular, proteínas de citoesqueleto y el plegamiento/ degradación de proteínas [70] [71] [72] [73].

2.2.3 Modelos animales deficientes en GCL

Para conocer la contribución funcional en fisiología y fisiopatología de la GCL se han desarrollado distintos modelos de delección total o parcial tanto de la subunidad catalítica como de la moduladora [74-77]. El ratón *Gclc* (-/-) se comporta como modelo letal embrionario y muere antes del día 9,5 de gestación debido a la importancia del GSH en la proliferación celular y desarrollo del embrión [78]. Sin embargo el ratón haploinsuficiente es viable y fértil, aunque estos animales tienen un 50% de actividad *Gclc* y el GSH también se ve reducido a la mitad, menos en el hígado que disminuye hasta el 20% compensando esta deficiencia aumentando los niveles de ascorbato [76].

Para evitar el problema de la letalidad embrionaria del ratón *Gclc* (-/-) se desarrolló un modelo de delección específica en el hígado [79]. Estos animales intentan compensar la reducción de GSH producida por la delección del gen, sobreexpresando la subunidad moduladora GCLm. Sin embargo desarrollan esteatosis espontáneamente a partir de las 4 semanas de vida, acompañada de disfunción mitocondrial, debido en parte a que los ROS producidos por este orgánulo no son detoxificados [75, 79].

El modelo de ratón deficiente para la subunidad moduladora no es letal en estado embrionario, aunque también produce una disminución significativa de los niveles de GSH [18, 77]. Estos ratones son altamente sensibles a estrés en diferentes tejidos y algo muy llamativo de su fenotipo es la disminución de la expresión de proteínas esenciales en metabolismo lipídico que les hacen aún más sensibles a dietas altas en grasa, desarrollando resistencia a insulina e hiperglucemia [80]. En este modelo también se han realizado experimentos para analizar el efecto de la disminución de GSH en la reactividad vascular, sin embargo, lo que se observó es que los ratones *Gclm*(-/-) estaban protegidos por vías compensatorias frente a los ratones heterocigotos que no eran capaces de detoxificar los ROS presentes debido a la disminución de los niveles de GSH [81].

2.3 Factor nuclear (derivado de eritrocitos 2)-2 (Nrf2)

La exposición de las células a antioxidantes y xenobióticos genera la inducción de una serie de genes y enzimas capaces de detoxificar cualquier sustancia deletérea para la supervivencia celular, entre las cuales se encuentra la GCL. Todas estas enzimas como HO-1, SOD, CAT, tienen en común los denominados sitios ARE en su promotor. Estos sitios ARE (secuencia *core* TGANNNGC) son reconocidos por el factor de transcripción Nrf2, que se une a ellos como heterodímero acompañado de alguna de las proteínas de la familia Maf. Nrf2 es el principal mediador de la respuesta adaptativa frente a estrés oxidativo siendo capaz de coordinar la inducción de más de doscientos genes [82-87]

Además de la activación de las enzimas de fase II, el Nrf2 está ligado a otra serie de procesos, como diferenciación, proliferación y crecimiento celular, apoptosis y hematopoyesis [88]. El factor Nrf2 tiene estructura de cremallera de leucina que contiene una conformación denominada de tapa y collar (*Cap and collar*) [89]. La estructura de Nrf2 está compuesta por siete dominios Neh conservados (Ver Figura 3). El dominio Neh1, es el que contiene el motivo bZIP que es el encargado de la unión a las secuencias ARE [90], mientras que el dominio Neh2 se encuentra en la región N-terminal y actúa como regulador negativo debido a su unión a Keap1 [91, 92]. El INrf2 o Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein1*) es una proteína citosólica que inhibe Nrf2 uniéndose a su dominio Neh2 [93]. Keap1 es una proteína rica en cisteínas [94, 95] y éstas han sido propuestas como sensores de estrés oxidativo y electrófilos [96]. La modificación de estas cisteínas por los diferentes activadores de Nrf2 permite formar aductos con Keap1 y así disociar el complejo Keap1-Nrf2, permitiendo la translocación de Nrf2 a núcleo [97, 98]. Además se ha observado que los residuos de cisteína pueden sufrir S-nitrosilación y S-glutathionilación [99-101].

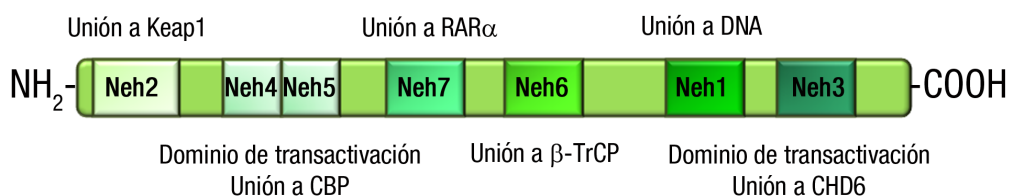


Figura 3: Estructura del factor de transcripción Nrf2. Nrf2 contiene 7 dominios Neh. EL dominio Neh1 se une al DNA a través del motivo bZIP, mientras que el Neh2 interacciona con Keap1. Neh4 y Neh5 son necesarios para la transactivación. El dominio Neh6 se une a la β-TrCP y por último el motivo Neh7 se une a RARα y suprime la actividad de Nrf2. Adaptado de Keum, Y.S. et al 2014.

La expresión de Nrf2 está regulada a nivel transcripcional, ya que en su región promotora contiene sitios ARE para autorregularse y sitios XRE que son reconocidos por el complejo AHR (receptor de aril hidrocarbano) y ARNT (translocador nuclear de AHR) que induce la expresión de enzimas de fase I como el citocromo P450 [102, 103]. A su vez la expresión de Nrf2 está fuertemente regulada a nivel de degradación por proteasoma ya que es marcado mediante ubiquitinación [104]. A través de Keap1, funcionan como adaptador del complejo Cul3-E3 ubiquitin ligasa, contribuyendo a una constante poli-ubiquitinación de Nrf2 [105]. Otro mecanismo de degradación es el que lleva a cabo GSK3 (glucógeno sintasa quinasa 3) junto con la proteína adaptadora b-TrCP. GSK3 fosforila Nrf2 estabilizándolo, pero a su vez facilita la unión de la b-TrCP, que forma un complejo con Cul1 y E3 ligasa para marcarlo por ubiquitinación y mandarlo a degradar [106, 107]. Además GSK3 también está involucrado en la traslocación de Nrf2 de núcleo a citosol, para inactivarlo y hacerlo susceptible de degradación, debido a la fosforilación de GSK3 sobre la Tyr quinasa Fyn, que fosforila directamente Nrf2 marcándolo para ser exportado [108]. La acetilación, al igual que la fosforilación o ubiquitinación también tiene un papel en la regulación de Nrf2, ya que el factor p300/CBP que acetila histonas para facilitar la descondensación de la cromatina, es capaz de asociarse con Nrf2 en respuesta a estrés oxidativo, aumentando la capacidad de Nrf2 para unirse al DNA (Ver Figura 4) [95, 109-112].

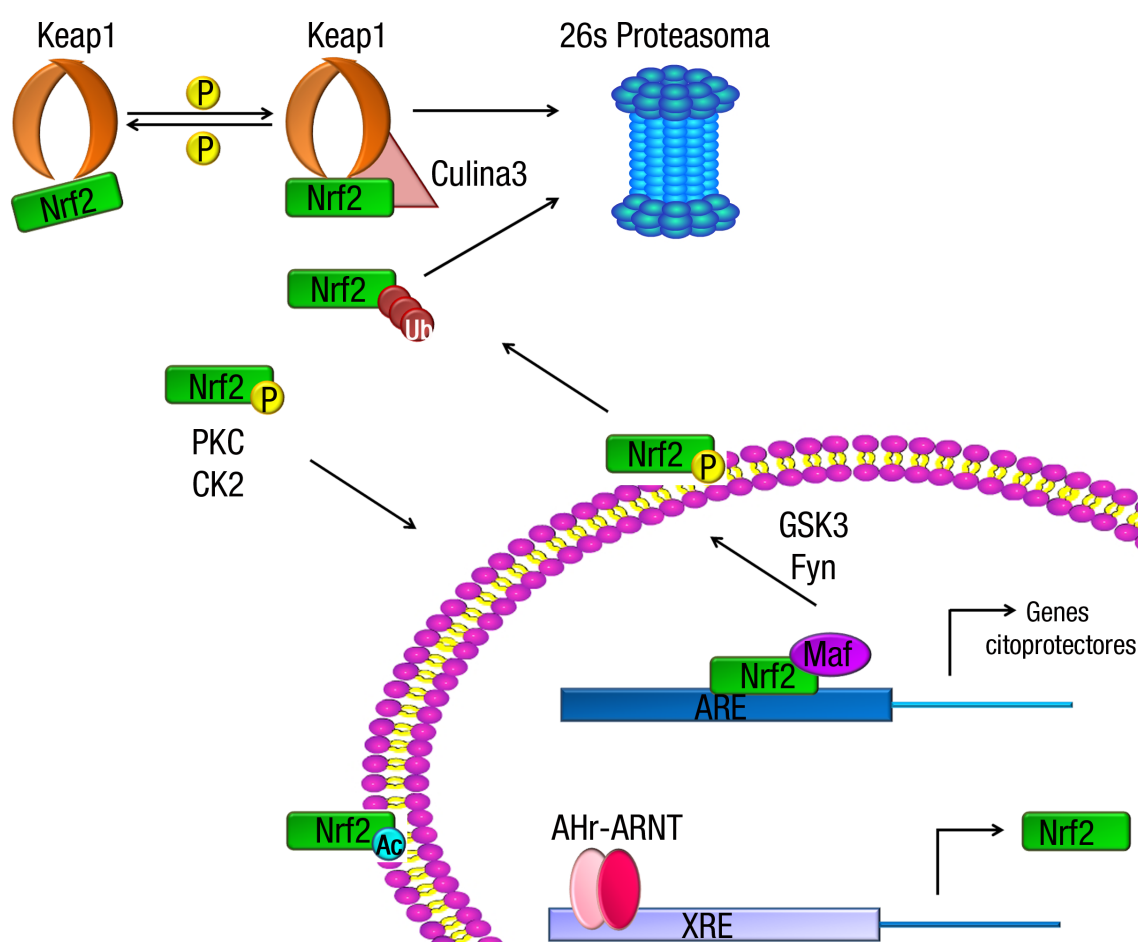


Figura 4: Esquema del sistema Keap1/Nrf2. En condiciones basales Nrf2 se encuentra unido a Keap1 en citosol. Keap1 actúa como adaptador para la interacción de la E3 ligasa (Culina3), encargada de ubiquitinar a Nrf2 y marcarlo para ser degradado vía proteasoma. Estímulos prooxidantes interaccionan con Keap1 modificando su conformación y liberando Nrf2. Nrf2 libre es entonces susceptible de ser fosforilado (PKC, CK2) y translocarse al núcleo. En núcleo Nrf2 se puede unir a las proteínas pequeñas Maf, que actuarán como activadores en la unión a las secuencias ARE dando lugar a la expresión de genes citoprotectores. Nrf2 también puede ser regulado por mecanismos de acetilación aumentando su habilidad para unirse al DNA. Además en núcleo se observa que el estrés oxidativo puede activar la expresión del propio Nrf2 a través de la unión de Ahr a las secuencias XRE en la región promotora de Nrf2. Por último Nrf2 puede ser translocado de nuevo de núcleo a citosol para ser degradado gracias a la cascada de fosforilación mediada por las quinasas GSK3 β / Fyn. Adaptado de Bryan, HK et al, 2013.

2.4 Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS)

ROS es un término colectivo que incluye diferentes especies químicas que se forman a partir de una reducción incompleta del oxígeno (Figura 5).

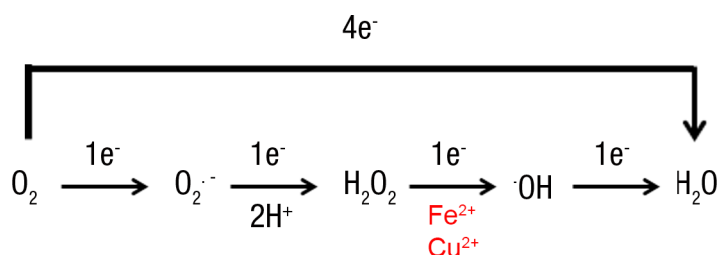


Figura 5: Producción de especies reactivas de oxígeno después de una reducción incompleta del oxígeno.

La reducción del oxígeno molecular por un electrón, media la iniciación de la producción de ROS. La primera especie que se produce es el anión superóxido, una especie altamente reactiva pero muy inestable, que se dismuta rápidamente a peróxido de hidrogeno. Esta reacción está catalizada por la superóxido dismutasa o puede ocurrir de forma espontánea. El peróxido de hidrógeno es también reducido gracias a la captura de un electrón que genera la formación del radical hidroxilo vía reacción de Fenton en presencia de Cu^{2+} o Fe^{2+} . Cada especie es estructuralmente distinta y por tanto tiene diferentes propiedades químicas. Todas especies quedan recogidas en la Tabla 1

La producción de ROS ocurre tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. Muchos tipos celulares son capaces de producir bajos niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en respuesta a diferentes estímulos extracelulares, que incluyen:

- Citoquinas: TGF- β 1 [113], Interleuquina-1 [114], Interleuquina-3 [115], interferón- γ [114] y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) [116].
- Factores de crecimiento de carácter peptídico, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) [117], factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) [116] e insulina [118].
- Agonistas de receptores acoplados a de proteínas G heterotriméricas como angiotensina II [119, 120], trombina [121], tirotrina [114], endotelina y bradiquinina [122].
- Flujo laminar y turbulento en células endoteliales [123].

Tabla 1: Principales especies reactivas de oxígeno

ROS	Principales características
$O_2^{\cdot-}$	<p>Radical libre</p> <p>Altamente reactivo</p> <p>Vida media baja</p> <p>Baja solubilidad, no difunde a través de las membranas biológicas</p> <p>Sistemas enzimáticos capaces de neutralizarlo: superóxido dismutasa (SOD)</p>
H_2O_2	<p>No radical libre</p> <p>Donador de dos electrones</p> <p>No altamente reactivo</p> <p>Vida media larga</p> <p>Difunde a través de membranas biológicas</p> <p>Origina HO^{\cdot} tras la interacción con metales por reacción no enzimática (R. de Fenton)</p> <p>Papel importante como molécula señalizadora (segundo mensajero)</p> <p>Sistemas enzimáticos capaces de neutralizarlo: catalasa, glutatión-peroxidasa, peroxirredoxinas</p>
$^{\cdot}OH$	<p>Radical libre</p> <p>Donador de un electrón</p> <p>Elevada reactividad frente a biomoléculas</p>

El estrés oxidativo puede producir daño sobre los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos. Además, está implicado en diferentes patologías como aterosclerosis [124, 125], envejecimiento [126], diabetes, neurodegeneración [127] y fibrosis. Sin embargo desde que el término ROS ha sido acuñado, el estrés oxidativo también se refiere a una ruptura en el control de la señalización redox. Existen distintas fuentes de producción de ROS dentro de la célula mencionándose a continuación las mejor conocidas (Figura 6).

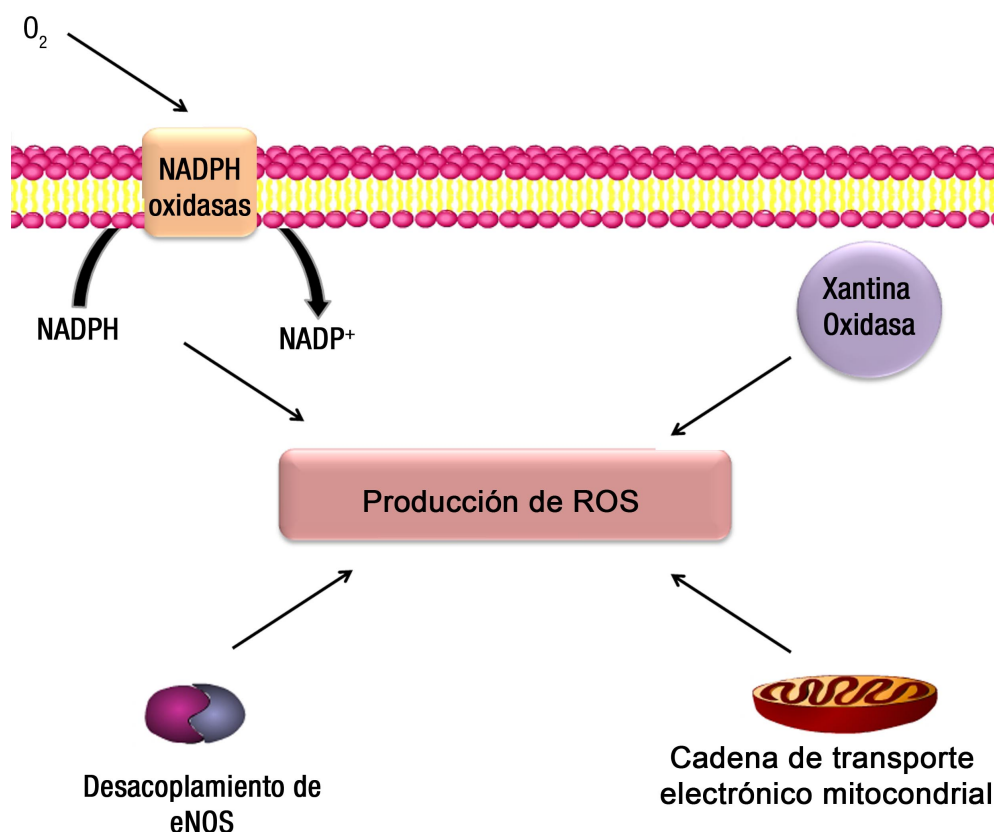


Figura 6: Fuentes principales de ROS. La generación de ROS proviene sobretudo de las NADPH oxidasas, de la cadena de respiración mitocondrial, desacoplamiento de eNOS en el endotelio y la xantina oxidasa.

2.4.1 NADPH oxidasas

Los miembros de la familia de las NOXs catalizan la producción de ROS como función principal [128, 129]. Las NOXs funcionan como transportadores de electrones transmembrana donde el NADPH actúa como donador de electrones, generándose O_2^- [130]. Existen 7 miembros de esta familia con una amplia distribución tisular (NOX1-5 y las oxidasas duales DUOX1-2) [131]. Su regulación y expresión es muy variada, además algunas como la NOX1, NOX2 y NOX5 producen principalmente O_2^- , mientras que NOX4 genera H_2O_2 y O_2^- .

2.4.2 Mitocondria

La mitocondria es otra de las fuentes principales de producción de ROS en condiciones fisiológicas, y se puede ver aumentada por distintos estímulos intracelulares. Las células endoteliales son preferiblemente glicolíticas para evitar el uso de O_2 y preservar su alta concentración en sangre y evitar la sobreexposición a las especies reactivas de oxígeno formadas por la mitocondria [132]. Esta producción de ROS es consecuencia de la fosforilación oxidativa asociada a la respiración

aeróbica que ocurre en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. A veces en algunos puntos de esta cadena los electrones que derivan de NADH o FADH pueden reaccionar de forma directa con el oxígeno o con otros electroaceptores y generar radicales libres. De este modo el 1% del O₂ consumido se convierte en ROS [133]. Recientemente se ha propuesto que estas especies reactivas producidas en la mitocondria podrían tener un papel esencial en la señalización celular dependiente de redox [134, 135].

2.4.3 Óxido nítrico sintasas (NOS)

Tras el descubrimiento del óxido nítrico en los años ochenta, se ha estudiado mucho la estructura y función de las enzimas encargadas de su síntesis [136]. El NO[•] se genera en los tejidos biológicos como un importante regulador de un amplio abanico de funciones [137, 138]. Es un conocido regulador de la presión sanguínea y el tono vascular, señalización neuronal y función inmunológica [139-141], pero es capaz de producir daño celular debido a la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) como por ejemplo el peroxinitrito. En mamíferos el NO[•] es producido por la familia de las óxido nítrico sintasas (NOS), de las cuales se conocen tres isoformas diferentes. Ésta la comprenden la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOSIII) y la neuronal (nNOS o NOSI) que tienen expresión constitutiva y una inducible (iNOS o NOSII). Estas enzimas pueden ser también fuente de O₂^{-•}. En el endotelio, que se encuentra expuesto a diferentes tipos de oxidantes, se puede producir también el desacoplamiento de eNOS, generando radical superóxido en lugar de NO. Como se ha comentado anteriormente las modificaciones por S-glutathionilación pueden producir un desacoplamiento de eNOS y alterar la función vascular [69], aunque existen otras causas de desacoplamiento de eNOS. Uno de los más relevantes es la reducción de su cofactor HB₄, debido a la oxidación producida por el incremento en la formación de anión superóxido o peroxinitrito, generándose la forma oxidada HB₂ [142]. Además de la oxidación la HB₄ se puede ver reducida por una inhibición en su síntesis de novo o bien en su reciclaje. Otros mecanismos que favorecen el desacoplamiento son la disminución de su sustrato la L-Arg o la acumulación del inhibidor ADMA [143]. Este desacoplamiento se ha estudiado en pacientes con disfunción endotelial derivada de distintas patologías vasculares como hipercolesterolemia, diabetes o hipertensión [144-146].

2.4.4 Xantina oxidasa (XOR)

La xantina oxidoreductasa conocida también como xantina oxidasa (XOR) , es una flavoproteína que cataliza uno de los últimos pasos del metabolismo de las purinas. Transforma la hipoxantina y xantina en ácido úrico, generando como productos secundarios $O_2^{\cdot -}$ o H_2O_2 [147]. Esta enzima existe en dos formas: como xantina deshidrogenasa (XDH) y como xantina oxidasa (XO) [148]. La actividad de la XDH en endotelio se transforma en XO debido a algunas modificaciones que incluyen la oxidación de grupos tioles y proteólisis. La proporción entre XO y XDH es la que determina la cantidad de ROS que producen estas enzimas [149], considerándose que un aumento de XO se relaciona con el daño vascular [150, 151].

2.5 Patologías en las que está implicado el estrés oxidativo

2.5.1 Disfunción endotelial

El sistema vascular está formado por una única monocapa de células endoteliales. Esto forma un órgano continuo y extendido que contiene más de 10^{13} células, que cubren un área aproximada de 1,7 m² y pesa 1 kg en un humano adulto [152]. Debido a su localización el endotelio actúa como una barrera natural y selectiva entre la sangre y otros órganos y tejidos. Es un órgano semipermeable y regula tanto la transferencia de pequeñas y grandes moléculas como de fluidos entre la sangre y el espacio intersticial. Esta estructura es importante para la integridad y mantenimiento de la pared del vaso y también la función circulatoria. Además de ser una barrera, es una monocapa metabólicamente activa. Las células endoteliales son capaces de controlar muchas funciones vasculares importantes como el tono vascular [153].

La disfunción endotelial es una condición en la cual el endotelio pierde su tendencia fisiológica de promover vasodilatación e inhibir la agregación plaquetaria y la adhesión leucocitaria [153]. Es un marcador de daño vascular y juega un papel muy importante en el inicio de muchos desórdenes vasculares como aterosclerosis, hipertensión y diabetes [152]. La característica principal de esta disfunción es la disminución en la biodisponibilidad de NO, que además normalmente se ve acompañada de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno [154].

2.5.2 Fibrosis

El estrés oxidativo juega un papel muy importante tanto en el inicio como en el desarrollo de los procesos fibróticos en enfermedades humanas [155]. La fibrosis es

la vía final común donde convergen muchos procesos inflamatorios, no resueltos y se define como la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular como colágeno y fibronectina [156]. Esta deposición de colágeno es indispensable en el proceso de reparación fisiológico, sin embargo junto con la acumulación de matriz extracelular, la cicatrización excesiva de los tejidos es la característica común de los procesos fibróticos en los diferentes tejidos del organismo [157]. En la fibrosis, los órganos que tienen un alto contenido epitelial como piel, riñón, pulmón e hígado reemplazan las células funcionales por depósitos de colágeno, perdiendo además la arquitectura característica de cada tejido. Como cada uno de estos órganos tiene un propósito distinto y está expuesto a diferentes factores ambientales, cada uno desarrolla de una forma diferente este proceso, aunque hay algunas características comunes a todos ellos (Ver Figura 7).

Una de las principales causas es la aparición de un daño recurrente o persistente, generalmente inflamatorio, en el epitelio que desencadena el proceso [156, 157]. Al menos cinco formas de reacción ante el daño epitelial pueden generar fibrosis en los tejidos. La primera es la muerte celular que ocurre a través de necrosis o apoptosis, aunque aún queda por aclarar si esta muerte celular es la que inicia el proceso o sólo es un marcador de que el daño es lo suficientemente severo como para desencadenar la respuesta fibrótica [158]. Una segunda respuesta común es la alteración de vías metabólicas, desencadenando estrés celular y la activación de múltiples vías con el fin de promover la supervivencia celular [159], aunque esta respuesta suele ser insuficiente. Otra forma de activación es la alteración de la transición epitelio-mesénquima (EMT), crucial durante el desarrollo embrionario [160, 161]. Tanto en el proceso normal de desarrollo como en el patológico, las células epiteliales van perdiendo una serie de marcadores como E-caderina disminuyendo la adhesión celular y aumentando la expresión de los factores de transcripción claves en la transición hacia un fenotipo mesenquimal: Twist y Snail1 [162], aunque es cierto que la transición EMT no es una fuente de células fibróticas.

Una cuarta forma de activación de la fibrosis sería el inicio de una respuesta inmune, en la cual las células epiteliales como primera barrera frente a insultos ambientales se activaría produciendo y liberando citoquinas que reclutarían neutrófilos, monocitos y leucocitos al órgano dañado, conduciéndolo al desarrollo de fibrosis [157]. Una inflamación moderada pero persistente es crucial para la progresión de esta patología siendo la eliminación de este estímulo inflamatorio una buena manera de frenar el

progreso del remodelado del tejido permitiéndole recuperar su arquitectura original [156].

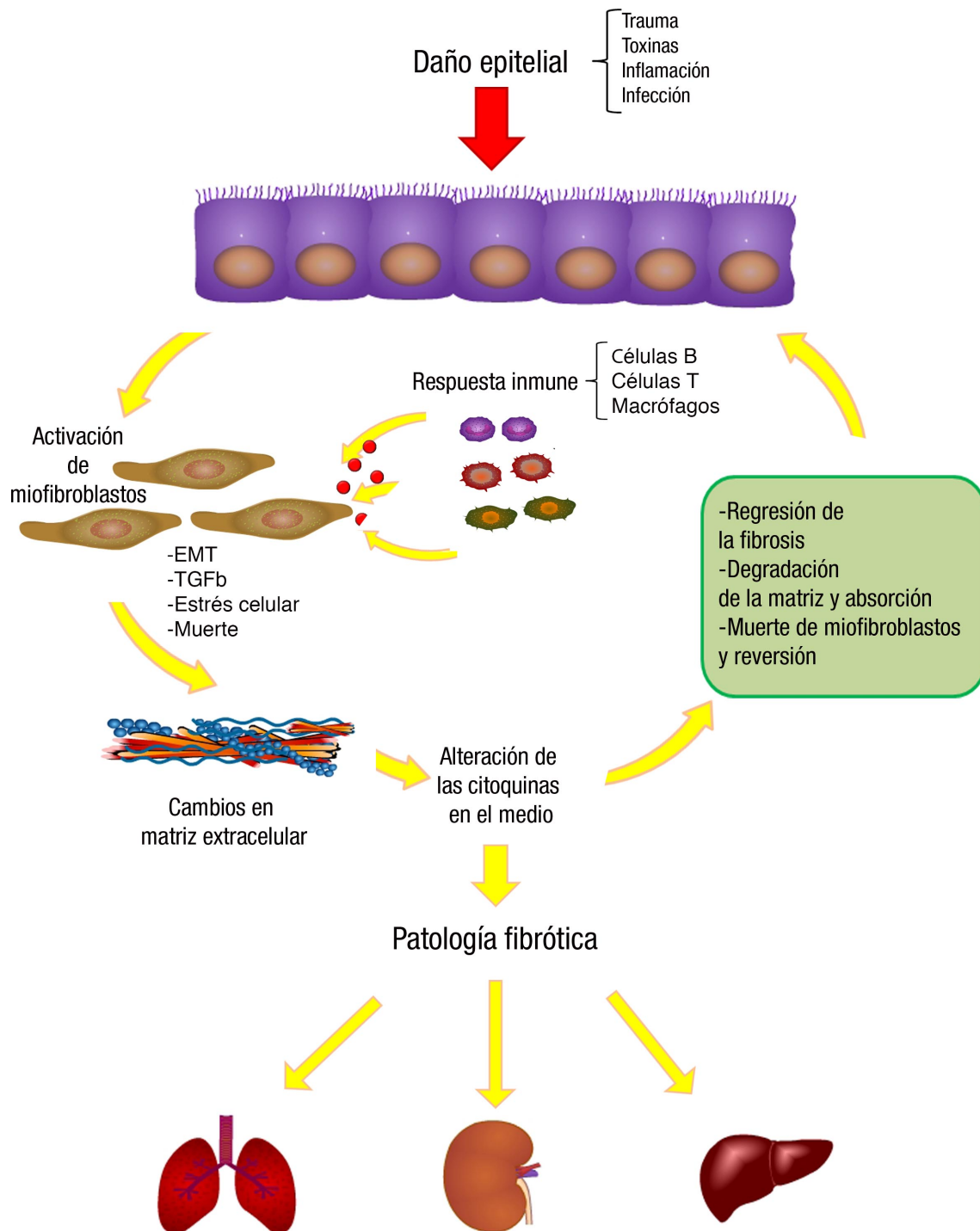


Figura 7: Esquema de la progresión y regresión fibrótica. La fibrosis ocurre como resultado de un daño sostenido en el epitelio. Este daño promueve la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que reclutan precursores mesenquimales para transformarlos en miofibroblastos. Los miofibroblastos activados depositan matriz en el medio extracelular. En condiciones fisiológicas, cuando el epitelio se encuentra reparado, la matriz se degrada y los miofibroblastos pasan a un estado inactivo o entran en apoptosis. En los procesos fibróticos la resolución se ve alterada y la respuesta fibrótica persiste generando graves consecuencias en los órganos afectados.

Por último una de las principales respuestas comunes al daño es la interacción entre integrinas y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en la respuesta epitelial. El TGF β es secretado cerca de todos los tejidos y órganos en mamíferos y es almacenado en su forma inactiva en la matriz extracelular (ECM) [163]. El aumento de la forma activa de TGF- β correlaciona con la progresión de la fibrosis en órganos como hígado, pulmón, corazón, riñón y piel [156]. Además el TGF β es capaz de inducir la diferenciación de células de fenotipo mesenquimal, como fibroblastos residentes o pericitos en miofibroblastos [157]. Estos miofibroblastos son las células patogénicas en la fibrosis debido a su capacidad de secretar y generar depósitos de matriz y tienen carácter contráctil, ya adquirido tras la expresión de la actina de músculo liso (α -SMA) [164].

2.5.2.1 Fibrosis renal

El caso de la fibrosis renal es de nuevo una reparación del tejido fallida debido a la prolongada exposición al daño que produce la acumulación de depósito de matriz en riñón, lo que genera un cambio en su arquitectura, debido a la contracción y aumento de la rigidez, resultando en una reducción en el flujo sanguíneo y en una incorrecta función de las nefronas y una separación entre las estructuras vasculares y tubulares [165, 166, 167.]. Las primeras células en responder al daño son las células epiteliales de los túbulos renales, que van perdiendo de forma progresiva su habilidad regenerativa, entrando en senescencia o apoptosis. El miofibroblasto como en el resto de las patologías fibróticas es el encargado del depósito de matriz en la región intersticial, y su característica principal es la expresión de α SMA [168]. Las principales fuentes de miofibroblastos renales serían las células mesangiales, como fibroblastos residentes y los pericitos que se diferencian tras ser activados. Sin embargo, las propias células epiteliales pueden diferenciarse a miofibroblastos mediante la transición epitelio-mesénquima (EMT), disminuyendo la expresión de marcadores epiteliales como E-caderina y la adhesión celular, ganando en paralelo la expresión del marcador miofibroblástico α SMA [157, 168, 169].

Existen múltiples evidencias que afirman que hay una relación entre la fibrosis renal y las especies reactivas de oxígeno. El aumento de ROS tiene un papel fundamental en el progreso fibrótico. Como se comentó anteriormente en el apartado (2.4 Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS)), siendo las NOX una de las principales fuentes de ROS. En el riñón, se ha observado que la expresión de NOX4 durante los procesos fibróticos es más abundante [170]. La expresión de NOX4 y el aumento de su

activación ha sido relacionado con la activación de la vía de la ya nombrada citoquina profibrótica TGF- β 1 [171]. Se sabe además que la transición epitelio mesénquima producida por TGF- β y que disminuye la respuesta transcripcional de Nrf2, reduciendo los niveles de GCLc y la síntesis de GSH, se ha visto atenuada en presencia de antioxidantes como NAC [172].

El modelo de fibrosis renal por obstrucción unilateral del uréter (UUO) genera una serie de cambios hemodinámicos y metabólicos que desencadenan el daño en los túbulos y la respuesta inflamatoria que dará lugar al daño fibrótico [173]. Este modelo se ha convertido en el principal y más reproducible para estudiar fibrosis renal *in vivo* ya que recapitula las características principales de la fibrosis [174].

2.5.2.2 Fibrosis hepática

El hígado tiene una gran adaptación al daño debido a su alta capacidad de reparación del tejido, pero la exposición prolongada al mismo, genera una respuesta inflamatoria que genera un cambio morfológico en su estructura. Las células adquieren un fenotipo fibroblástico y empiezan a depositar matriz extracelular dando lugar a fibrosis, que puede progresar a cirrosis y hepatocarcinoma [175].

La fibrosis hepática se puede clasificar dependiendo de su origen. El primer tipo sería la derivada de una infección por el virus de la hepatitis humana (HVC o HVB), el segundo tipo es aquel que se desarrolla como consecuencia del consumo de alcohol, que deviene en cirrosis. Finalmente la fibrosis no alcohólica que empieza como esteatosis o acumulación lipídica, pasa por un proceso fibrótico intermedio y acaba en cirrosis hepática [175].

Los hepatocitos son en este caso, las células diana de estos insultos y las que debido a la liberación de citoquinas proinflamatorias reclutan distintas células del sistema inmune amplificándose la respuesta [175]. Las células estrelladas o estelares son las que juegan un papel más relevante en la fibrosis en respuesta a TGF β , citoquinas o interleuquinas, transformándose a células con fenotipo fibroblástico [176, 177]. Estas células estelares son los “pericitos del hígado” y se encuentran en el espacio subendotelial entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales [176]. Además de las células estelares existen otros tipos celulares que pueden contribuir al proceso fibrótico, como fibroblastos intersticiales y células epiteliales del conducto biliar [178].

Otra forma de activación de las células estelares tiene que ver con un aumento de estrés oxidativo generado por las células de Kupffer (macrófagos residentes en el

hígado) o de los hepatocitos dañados [179]. La reducción de este estrés oxidativo mediante la activación de la vía del factor de transcripción Nrf2 se traduce en mejoras en la progresión de la patología [180]. En modelos en los cuales el factor Nrf2 o la subunidad catalítica de GCL están reducidos, se ha observado que se desarrolla de forma espontánea esteatosis hepática [79, 181].

2.6 Los microRNAS

Los microRNAs son RNAs endógenos de cadena sencilla y pequeño tamaño (22-26 nucleótidos). Fueron recientemente descubiertos como un novedoso mecanismo de regulación post-transcripcional de la expresión génica, ya que son capaces de unirse por complementariedad de secuencia parcial o total, a las regiones 3'-UTR de diferentes RNA mensajeros, bien impidiendo su traducción a proteína, inhibiéndola o provocando su degradación, jugando así un papel muy importante en la regulación de procesos biológicos [182, 183].

Desde que en 1998 Craig Mello y Andrew Fire demostrasen que el efecto del denominado silenciamiento transcripcional era producido por la formación de RNA de doble cadena en *C.elegans*, y el descubrimiento del primer microRNA lin-4 en este mismo nematodo [184] [185], el progreso sobre el conocimiento de estas moléculas ha sido exponencial (Figura 8).

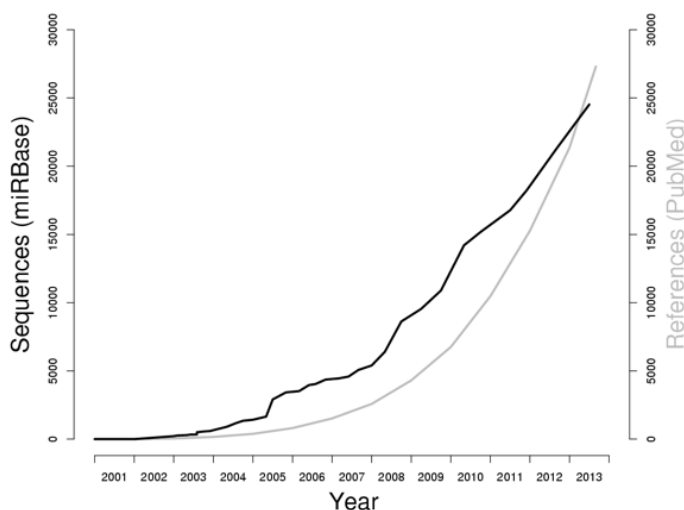


Figura 8: Gráfica comparativa entre el número de microRNAs secuenciados hasta la actualidad y el número de publicaciones sobre microRNAs.(Fuente mirbase.org)

En la última actualización de una de las principales bases de datos de microRNAs, miRBase (versión 21, Junio 2014) 28645 microRNAs han sido anotados en más de 142 especies. Esta base de datos recoge alrededor de 2042 miRNAs correspondientes a humano y 1281 murinos [186] [187] [188].

La gran mayoría de los microRNAs están altamente conservados entre vertebrados como humano, ratón, chimpancé e incluso entre invertebrados como *C.elegans* .

2.6.1 Organización genómica de los microRNAs

Los miRNAs se originan a partir de moléculas precursoras de tamaño variable, doble cadena y bucles a modo de horquilla (*stem loops*), capaces de originar RNA con estructuras secundarias [189] [190-192]. La transcripción de estos miRNAs, depende de su localización en el genoma. Pueden estar localizados en regiones intrónicas del genoma (un 80% aproximadamente) [192]. El 20% restante están codificados en regiones intergénicas, genes no-codificantes o incluso exones [193].

Muchos de ellos además se encuentran formando familias, compartiendo la secuencia de nucleótidos que se une a la región 3'-UTR del mRNA diana, conocida como región semilla o “seed”. También pueden estar codificados en el mismo grupo génico o “*cluster*”, encontrándose sometidos a la misma regulación transcripcional [183, 194]. Sin embargo, no todos los miembros de un mismo *cluster* se expresan al mismo nivel, sugiriendo que estos miRNAs pueden ser procesados o modificados específica y post-transcripcionalmente [195-198]. En el caso de los microRNAs derivados de intrones su transcripción puede depender de la del gen hospedador en el que se encuentra y de esta manera se explicaría la especificidad tisular. Otros microRNAs pueden tener su propio promotor y expresarse de forma independiente.

2.6.2 Biogénesis de los microRNAs

Los microRNAs maduros son moléculas de unos 22-26 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Estos derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y finaliza en el citoplasma donde ejercen su función. Las principales enzimas candidatas para la transcripción de microRNAs son la RNA polimerasa II y la RNA polimerasa III. Sin embargo, tanto los microRNAs procesados a partir de intrones, como los microRNAs no intrónicos son transcritos por la RNA pol II [199] [200]. La RNA Pol II produce un transcrito primario de RNA, denominado pri-miRNA, que puede llegar a ser tan largo como la propia secuencia de origen del microRNA, oscilando entre varias kilobases y unos pocos cientos de bases [201]. El análisis de varios de estos precursores o pri-microRNAs, mostró que todos ellos contienen una caperuza 5'-7-metil-guanosina (cap) y una cola poly-A en 3' similar a la de un mRNA [199, 202]. Un pri-microRNA estándar contiene una región central o troncal (*stem*) de RNA de doble cadena (dsRNA), de unos 30-40

nucleótidos, un lazo terminal (*loop*) y dos regiones de RNA de cadena sencilla (ssRNA) a cada extremo opuesto a la región central.

2.6.3 Procesado de los microRNAs en el núcleo: Drosha y Dgcr8

La maduración de los microRNAs sigue una serie de pasos que ocurren tanto en núcleo como en citoplasma. Estas reacciones de procesado están catalizadas por diferentes endonucleasas (RNAsas III) que reconocen RNA de doble cadena [203] [201]. El primer paso tiene lugar en el núcleo donde el pri-microRNA, libera un nuevo precursor intermedio (60-70 nt) llamado pre-miRNA [201] [204] [205]. Este proceso lo lleva a cabo Drosha, que corta ambas hebras de forma escalonada, con el corte típico de RNAsas de tipo III, quedando así un fosfato libre en 5' y un saliente (*overhang*) de 2 nt en 3' [205] [206]. La proteína Drosha habitualmente colabora con una proteína de unión a RNA de doble cadena, Di George syndrom critical región 8 (DGCR8) formando así el “microprocesador” [205, 207-209]. DGCR8 es por tanto un factor esencial en la ruta de procesado de los microRNAs, ya que es la encargada de reconocer la región central y la de cadena sencilla del RNA.

2.6.3.1 microRNAs intrónicos

Existe una ruta alternativa para la biogénesis y procesamiento de los microRNAs en la cual ciertos intrones liberados tras el corte del mRNA hospedador (*splicing*) mimetizan las características de un pre-miRNA y entran en la ruta de procesado escapando del corte producido por Drosha [210]. Estos denominados miRtrons, a pesar de tener claras similitudes con un microRNA, se diferencian al llegar al extremo del intrón. El apareamiento entre las bases de este RNA no es mayor de los 20-22 nt de apareamiento del dúplex de RNA miRNA/miRNA*, que sería necesario para el corte mediado por Drosha, y en su lugar conserva sitios canónicos de corte por espliceosoma [211], siendo este corte por espliceosoma necesario para la maduración de este tipo de miRNAs [212]. Estas evidencias se vieron reforzadas al analizar el ratón deficiente en Drosha, que no mostró un efecto significativo en el número de miRNA intrónicos [210]. Por el contrario cuando se silenció Dicer, otra exonucleasa de la que hablaremos más adelante, el ratio de pre-miRNA frente a microRNAs maduro aumentó de forma significativa [210].

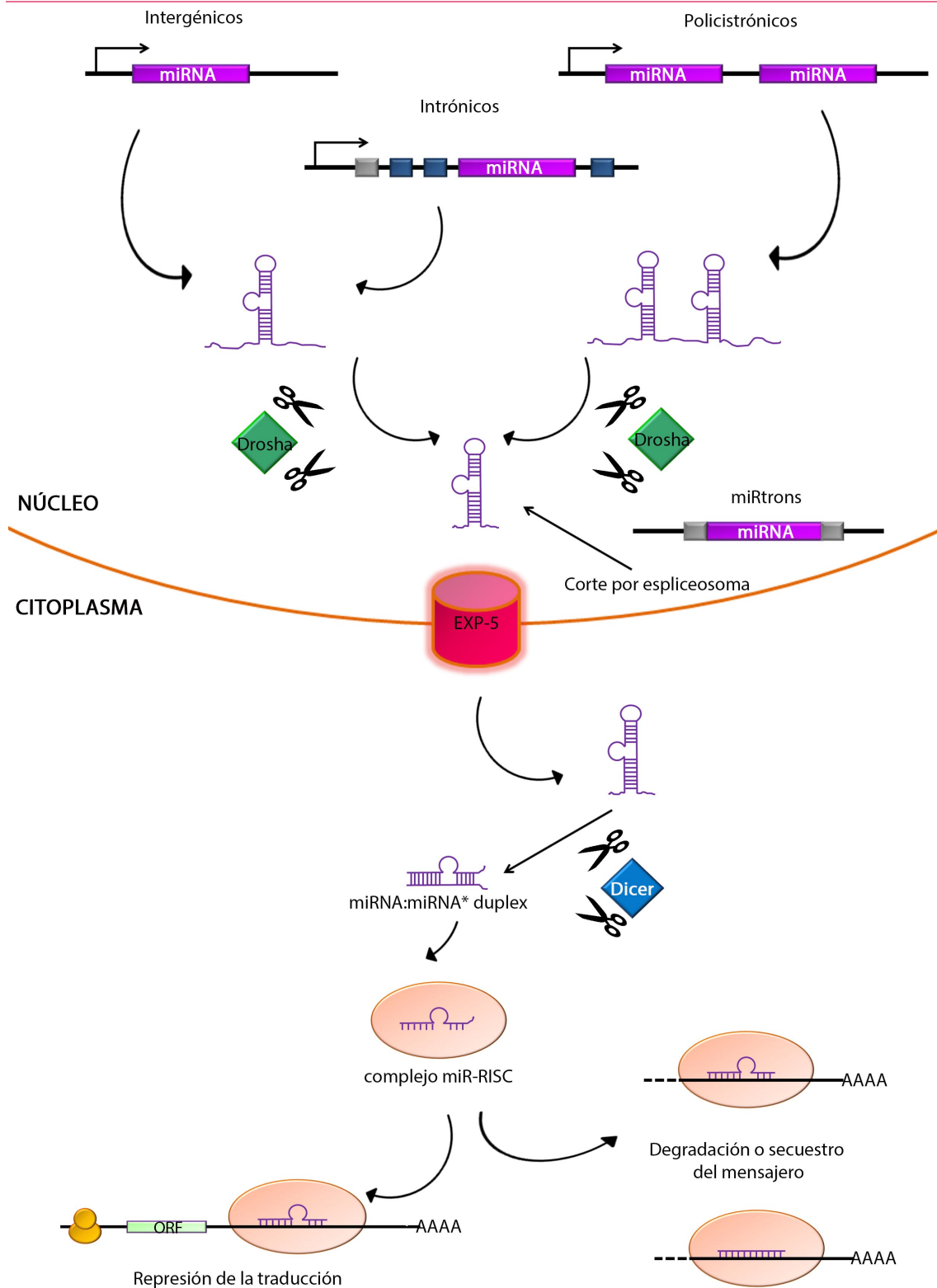


Figura 9: Biogénesis de los microRNAs y mecanismo de silenciamiento génico en citosol.

2.6.4 Transporte del núcleo al citoplasma. Exportina-5

Los microRNAs deben ser transportados desde el núcleo al citoplasma para poder ejercer su función. Es un transporte activo, mediado por la exportina-5. Esta enzima pertenece a la familia de factores de transporte núcleo-citoplásmicos de las carioferinas y necesita la participación de RAN, que es un cofactor que une GTP aumentando la afinidad por el sustrato cargo, en este caso el microRNA, del complejo exportador ahora formado por Exp-5-RAN-GTP [213] [214] [215]. Este complejo es independiente de la secuencia del RNA, pero no de su estructura. Sólo unos pequeños RNAs que contienen un tallo de 16 pb y un *overhang* en 3', como los pre-miRNAs [215, 216]. En el citoplasma, la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado. Además, la exportina-5 tiene también un papel en la estabilización de los pre-microRNAs nucleares, existiendo algunos trabajos que sugieren que en ausencia de la exportina-5 hay una clara disminución de microRNAs citosólicos, aunque no se ve acompañado por una acumulación de los mismos en el núcleo [217].

2.6.5 Dicer

Una vez en el citoplasma la siguiente endonucleasa RNasa III que actúa es Dicer. Esta enzima fue primeramente descrita por su papel en la generación de pequeños RNAs interferentes (siRNA) [218] y más tarde se describió su implicación en la ruta de procesamiento de los microRNAs [219, 220], llevando a cabo un papel muy similar al que tiene en el procesamiento de los RNAs interferentes. Dicer reconoce RNA de doble hebra como los microRNAs, pero tiene predilección por aquellos RNAs que tienen un *overhang* en 3' en la base de su estructura. Cuando Dicer reconoce estos RNAs, se une a ellos cortándolos de tal forma que elimina la horquilla característica de los precursores, dejando un nuevo fosfato libre en 5' y otro 3' *overhang*, generándose un dúplex de RNA "imperfecto". Este dúplex de RNA contiene el microRNA maduro y un fragmento de tamaño similar que procede del brazo opuesto del pre-miRNA (miR*) [221]. Aunque el dúplex miRNA/miRNA* es producido de forma simétrica por transcripción, la abundancia de una u otra hebra tras el procesamiento es asimétrica. El denominado miRNA* (hebra pasajera) que procede del brazo opuesto del premiR, también ha sido encontrado en genotecas de clones de microRNAs, pero con una proporción 100 veces menor, indicando que tiene una vida inferior a la hebra guía [221-223] [224], ya que es menos estable en su extremo 5'. Sin embargo, algunos trabajos aseguran que esta hebra también es capaz de reconocer dianas propias de manera funcional [225] [226] [227].

Por lo tanto, Drosha y Dicer trabajan de forma sinérgica para aumentar la producción del microRNA y aumentar la precisión del producto final [205]. La especificidad en el corte generado por Drosha, es la que determina cual será la maduración del microRNA. Por lo tanto es Drosha y no Dicer la que determina está especificidad gracias a su reconocimiento de estructuras secundarias en la base del *stem loop* [205, 228].

2.6.6 Mecanismos de acción de los microRNAs

Tras el procesamiento, el dúplex de microRNA interacciona con un complejo multiproteico denominado RISC “RNA-induced silencing complex” [229, 230] [231, 232]. El complejo RISC identifica dianas de mRNA basándose en la complementariedad o apareamiento entre bases. Esta complementariedad suele ser perfecta en plantas y parcial en vertebrados entre el mRNA y el microRNA. Después las endonucleasas de este complejo cortan en medio de la secuencia de reconocimiento [230]. El complejo RISC contiene un miembro de la familia argonauta en su *core*, y se divide en diferentes subtipos según el número de argonautas que tenga asociado.

2.6.6.1 Las proteínas de la familia Argonauta

Las proteínas de la familia argonauta se subdividen en dos subfamilias en función de la homología de sus secuencias: la subfamilia AGO y la subfamilia PIWI. Las proteínas de la subfamilia PIWI han sido implicadas en la regulación del desarrollo de las células germinales, autorrenovación de las células troncales y el silenciamiento de retrotransposones [233]. Las proteínas de esta familia se unen a una clase de RNAs no codificantes de pequeño tamaño llamados piRNAs (“Piwi- interacting RNAs”).

2.6.6.2 La subfamilia AGO

Las proteínas de la subfamilia AGO (Ago1-5) son los elementos más importantes del complejo silenciador RISC, y están implicadas en la represión traduccional y en la degradación de los mRNAs. De todos los miembros de la subfamilia, Ago-2 muestra capacidad endonucleasa y debido a su importancia durante el silenciamiento génico mediado por miRNAs, existen una gran cantidad de elementos que regulan su estabilidad [234, 235].

2.6.6.3 Corte del mRNA

Se estima que alrededor de 1/3 de los genes son regulados por microRNAs [226, 236, 237]. Estos microRNAs pueden dirigir el complejo RISC para que disminuya la expresión, principalmente por dos mecanismos: corte del mRNA o represión traduccional. La elección de un mecanismo u otro depende de la complementariedad con la secuencia diana. Si este mensajero tiene suficiente complementariedad será cortado, entre los nucleótidos 10 y 11 [238].

2.6.6.4 Represión traduccional

Los mecanismos por los cuales los miRNAs pueden bloquear la traducción son objeto de constante debate, pero existen diversos modelos para explicar este bloqueo.

Se han descrito cuatro modelos. En el primero se propone la capacidad del complejo de silenciamiento para promover la deadenilación del mRNA facilitando la eliminación de la caperuza 5' del mRNA y la degradación del mismo [239, 240]. En el segundo modelo se ha propuesto que los miRNAs pueden reprimir la traducción después del paso de iniciación de ésta [241-244].

En los otros modelos la inhibición ocurre a nivel de la iniciación y la elongación proteica, ya que no se observa una reducción de los transcritos pero si de la cantidad de proteína [245] [246].

2.6.6.5 Reconocimiento de la diana

El reconocimiento entre el microRNA y su diana obedece a la interacción existente entre el microRNA y regiones complementarias en la región 3' no codificante del mRNA (3'-UTR). La característica más importante, que se extrae de los datos experimentales es que para un buen reconocimiento de la diana, es necesario un apareamiento tipo Watson-Crick entre los nucleótidos 2 y 8 del extremo 5' del miRNA y el 3'-UTR del mRNA. Esta región se denomina región semilla (*seed sequence*) y es el punto de partida para muchos de los algoritmos de predicción [247]. Este apareamiento es más eficaz que el que se produce en otros heptámeros del miRNA [248]. Se ha propuesto que el papel de RISC sea el de presentar el core de la secuencia a los nucleótidos del mRNA [249]. Las herramientas actuales de predicción de microRNAs son Targetscan, PicTar, EMBL y EIMMo que tienen un alto grado de solapamiento porque su algoritmo se basa en el apareamiento de la región semilla. Sin embargo no son 100% idénticas ya que por alguna razón existe un solapamiento imperfecto [236].

Las posiciones en el mRNA con mayor posibilidad de apareamiento con el miRNA, suelen estar al menos 15 nucleótidos más allá del codón de parada del mRNA, y alejados del centro en caso de 3'-UTRs largos [250], ya que tienen más probabilidad de tener interacciones consigo mismos o con otros segmentos, mientras que los extremos no tienen esta oportunidad [236, 250]. También son buenas candidatas aquellas posiciones con abundancia en regiones ricas en AU cercanas a los sitios de unión u otras medidas que faciliten la accesibilidad y la proximidad a sitios para microRNAs que se co-expresan en condiciones semejantes [236, 248, 250, 251]. Aunque la mayoría de la investigación realizada en microRNAs de metazoos ha sido en las regiones 3'-UTRs, algunos experimentos han demostrado que el apareamiento también puede darse en regiones como la 5'-UTR y en las regiones codificantes (ORF) [243, 252].

Por ejemplo los avances en secuenciación masiva han revelado la gran abundancia de microRNAs endógenos presentes en el núcleo. Experimentos *in silico* de reconocimiento de dianas sugieren que existen miles de potenciales sitios de unión para microRNAs: sitios de interacción en promotores, que han sido validados mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Otra observación muy interesante es que este mecanismo de interacción en la región promotora, en el que pueden participar Ago-2 y microRNAs puede tener un efecto activador de la expresión génica [253-255].

2.6.9 Nomenclatura para denominar los microRNAs y sus variantes

El gran auge en el descubrimiento de los microRNAs hizo necesario proponer un nuevo sistema de nomenclatura para cada nueva molécula descubierta. Además de la numeración se han añadido letras y símbolos para facilitar la identificación del microRNA y su localización en la molécula precursora. Esta nomenclatura se resume en la siguiente inhibición.



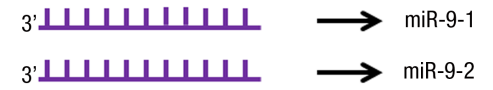


Tabla 2 [256].

2.6.10 Técnicas empleadas para la pérdida o ganancia de función de microRNAs

La mejor forma de estudiar la relevancia de los microRNAs es examinando la implicación que tienen los cambios en su expresión. Existen distintas estrategias específicas tanto para su sobreexpresión como para su inhibición.

Introducción

Tabla 2: Clasificación de microRNAs por nomenclatura

Identificador	Significado	Ejemplo
5p y 3p	5p y 3p denotan miRNAs generados a partir de secuencias opuestas en la estructura de un mismo pre-miRNA	
*	El * marca el miRNA que se considera subexpresado en las células	
Números	Los números denotan miRNAs que se encuentran en diferentes loci pero que comparten la misma secuencia madura	
Letras	Las letras denotan miRNAs en diferentes loci genómicos y comparten gran parte de la secuencia del miRNA maduro con sólo algunas bases de diferencia	
"as"	"as" denota miRNAs que se encuentran en la misma localización cromosómica pero sus promotores se encuentran en cadenas opuestas del DNA	

La regulación *in vitro* de los microRNAs normalmente se lleva a cabo con experimentos de transfección que permiten encontrar o validar dianas o examinar el efecto fisiológico que ejercen sobre la célula. Los denominados miRNA mimics consisten en oligonucleótidos de doble hebra que contienen la secuencia madura del microRNA de interés. Existen también vectores de expresión en los cuales se encuentra la secuencia del *stem loop* del microRNA, y que una vez expresado en la célula será procesado por la maquinaria habitual. Otras formas de sobreexpresión de microRNAs más adecuadas para experimentos diseñados *in vivo*, son el uso de adenovirus o lentivirus. El uso de lentivirus ofrece la ventaja de integrarse en la célula infectada y ofrecer un gran aumento de expresión del microRNA. También se pueden utilizar dúplex sintéticos de RNA con la hebra guía del microRNA maduro, mientras que la hebra complementaria está modificada, habitualmente por moléculas de colesterol que facilitan la entrada del dúplex en la célula.

Las herramientas para inhibir la expresión de los microRNAs son más variadas: los denominados antimisRs son oligonucleótidos de hebra sencilla y complementaria al microRNA maduro, con diferentes modificaciones que les permiten ser estables en el contexto celular. Otras técnicas muy útiles son las denominadas borradores de microRNAs o esponjas de microRNAs (Figura 10) [257] [258]. Son vectores que expresan sitios de unión para un microRNA de forma repetida. La diferencia es que los borradores al contener sitios exactamente complementarios al microRNA dan lugar a corte y degradación de estos RNAs, mientras que los RNA esponjas contienen secuencias parcialmente complementarias lo que produce una unión con el microRNA

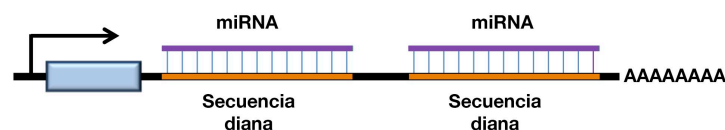
más prolongada y una mayor capacidad de anulación. Existen también adenovirus o lentivirus que contienen un shRNA que silencia el miRNA de forma más eficaz ya que ataca al pri-miRNA.

Se puede bloquear también el mecanismo de acción de los microRNAs utilizando RNA máscaras, que se unen a las secuencias dianas para el mRNA impidiendo su silenciamiento [259].

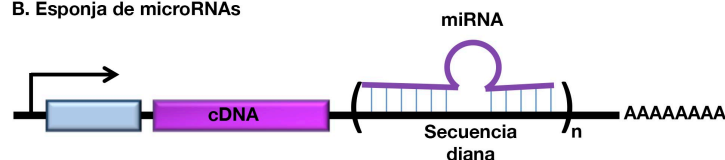
Dentro de los antagomiRs existen diferentes aproximaciones para su uso *in vivo* e *in vitro*. Se pueden usar oligo deoxinucleótidos complementarios al microRNA [260], sin embargo las modificaciones 2'-O-metilo (Chol) se utilizan para hacerlo más resistente a nucleasas y mejoran la unión al RNA. Por otro lado la modificación LNA hace que la formación del dúplex antimiR-miRNA. Dentro de los antagomiRs existen diferentes aproximaciones para su uso *in vivo* e *in vitro*. Las modificaciones 2'-O-metilo se utilizan para hacerlo más resistente a nucleasas y mejoran la unión al RNA. En cambio la modificación LNA hace que la formación del dúplex antimiR-miRNA sea termodinámicamente estable, mejorando su especificidad y eficiencia (Figura 10) [261].

I. Inhibición de microRNAs por sobreexpresión de secuencia diana

A. Borrador de microRNAs

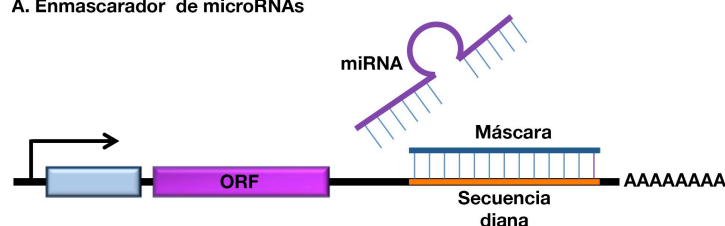


B. Esponja de microRNAs



II. Bloqueo de microRNAs por sobreexpresión de oligodeoxinucleótidos complementarios a la secuencia diana

A. Enmascarador de microRNAs



III. Bloqueo de microRNAs por sobreexpresión de RNA de hebra sencilla complementarios al miRNA

A. Nucleótidos modificados



B. Nucleótidos no modificados

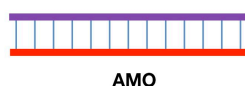


Figura 10: Diferentes herramientas para inhibir la expresión de microRNAs. I) Inhibición de microRNAs por sobreexpresión de secuencia diana. Este mecanismo se basa en la eliminación y bloqueo de microDNAs mediante la complementariedad de unión a secuencias diana sobreexpresadas utilizando diferentes vectores de expresión. A) Borrador de microRNAs. Vector de expresión que contiene un gran número de secuencias diana para un microRNA con complementariedad total. B) Esponja de microRNAs. Vector de expresión que contiene n repeticiones de la secuencia diana de un microRNA específico con complementariedad parcial. II) Bloqueo de microRNAs mediado por sobreexpresión de oligodeoxiribonucleótidos complementarios a la secuencia diana. A) Enmascarador de microRNAs. Oligodeoxiribonucleótidos complementarios a la secuencia diana, que se unen a ellas impidiendo la unión del microRNA, sin afectar la expresión del mRNA diana. III) Bloqueo de microRNAs por sobreexpresión de RNA de hebra sencilla complementarios a la secuencia del microRNA. A) Nucleótidos modificados. AntagomiR y LNA que están modificados químicamente haciéndoles menos sensibles a degradación. B) Nuclótidos no modificados (AMO). Secuencias de RNA complementarias al microRNA que no han sufrido ninguna modificación química. Adaptado de Poller, Hajjar et al. 2010, Cardiovasc Res.

2.7 RedoximiRs

En los últimos años se ha avanzado en el descubrimiento de microRNAs y se ha intentado agrupar en diferentes tipos para que sea más fácil clasificarlos. Debido a la

amplia distribución de dianas celulares que los microRNAs tienen, no es difícil pensar que el equilibrio redox de la célula puede estar también regulado por ellos. De hecho, existen gran variedad de publicaciones que relacionan diferentes microRNAs, con el regulador clave de la respuesta antioxidante Nrf2 [262-264] y con las enzimas implicadas en la producción de ROS [265-267], habiéndose acuñado el término de redoximiRs para definirlos [268]. Además, las alteraciones en el equilibrio redox celular pueden alterar la propia biogénesis y maduración de los microRNAs. La proteína Dicer, una de las endonucleasas implicadas en la maduración de éstos, se encuentra disminuida en modelos de envejecimiento y estrés provocado por peróxido de hidrógeno, lo que genera una alteración en la maduración y número de microRNAs [269, 270]. Esta alteración podría estar relacionada con la presencia de secuencias ARE en la región promotora de la proteína Dicer tanto en el gen humano, como en el murino [269].

Otra de las enzimas implicadas es DGCR8, necesaria para el correcto funcionamiento de la nucleasa Drosha. Dado que requiere del grupo hemo unido a hierro para realizar su actividad podría también verse regulada por el estado redox, ya que Nrf2 regula la actividad de hemoxigenasa y por lo tanto un aumento en su catabolismo daría lugar a una bajada en los niveles de microRNAs [271]. También la exportina-5 implicada en la salida de los microRNAs de núcleo a citosol puede estar implicada en la regulación redox de la maduración de los microRNAs [272]. Asimismo, las modificaciones mediadas por estrés oxidativo sobre enzimas de carácter epigenético como DNMT o HDAC [273, 274], o incluso sobre los propios microRNAs maduros pueden tener influencia en sus niveles de expresión [275].

Finalmente, han sido descritos microRNAs que regulan el equilibrio redox celular, bien regulando el denominado reguloma de Nrf2 o bien a las enzimas encargadas de generar ROS en distintos tipos celulares y tejidos. Los microRNAs que regulan directamente Nrf2 son miR-153, miR-27a, miR-142-5p y miR-144 [262, 263, 276-278]. El inhibidor de Nrf2, Keap1 también es susceptible de regulación por microRNAs como miR-200 [279], y el represor transcripcional Bach1 [280]. La implicación de microRNAs en distintos tipos de patologías ha revelado nuevas dianas implicadas en la producción de ROS, como puede ser NOX4, que puede ser regulada por miR-25, miR-146a, y miR-23a [266], incluso unos cuantos microRNAs como miR-210 y miR-128a han sido identificados en el interior de la mitocondria con el probable objeto de regular su actividad metabólica [281].

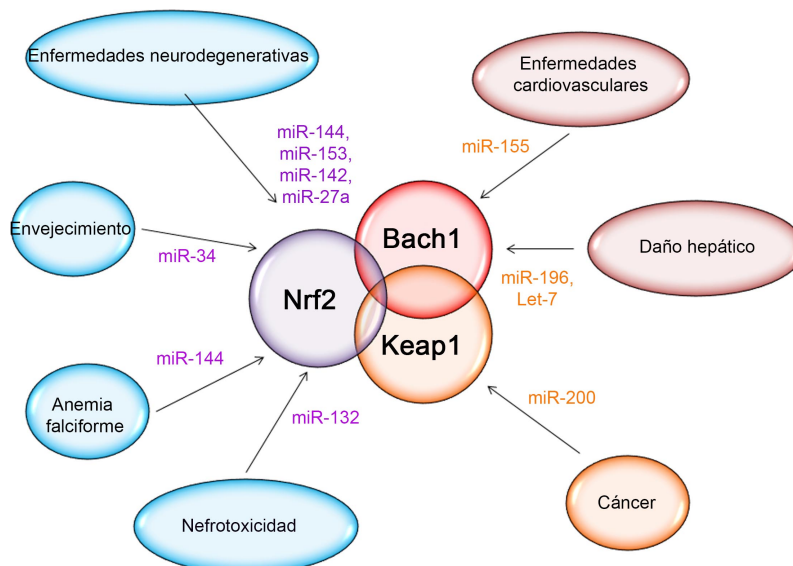


Figura 11: RedoximiRs implicados en diferentes patologías relacionadas con estrés oxidativo.

2.8 microRNAs en el endotelio

Las familias de microRNAs más expresadas en endotelio, se han agrupado en el denominado grupo de los “endomiRNAs” [282]. Entre ellos encontramos miR-126 y los cluster de miR-17-92, miR-23-27-24 y miR-222-221. Entre estos, miR-126 es el más importante y posiblemente el único microRNA exclusivamente endotelial [283, 284]. El cluster miR-17-92 es un microRNA policistrónico que codifica para seis microRNAs maduros, todos ellos expresados en células endoteliales e implicados en la integridad vascular y angiogénesis [282, 285, 286]. El siguiente cluster miR-23-27-24, cuyos microRNAs se encuentran en órganos altamente vascularizados y han sido relacionados con angiogénesis. De ellos cabe destacar miR-24 que se induce en respuesta a estrés oxidativo [287-289]. Por último, se encuentra el cluster miR-222-221, implicado en el remodelado vascular y en la migración de células “tip” y proliferación [290, 291]

2.9 FibromiRs

Teniendo en cuenta las características y los cambios que se producen durante el proceso de fibrosis, es esperable que exista también una alteración en la expresión de microRNAs. Este grupo de microRNAs se ha denominado fibromiRs [292]. Estos microRNAs atraen la atención como alternativa para terapias antifibróticas. Al igual que los anteriormente mencionados redoximiRs, modulan y están modulados por diferentes vías relacionadas con la generación de la fibrosis, ya que se ha descrito que la activación de SMADs está implicada tanto en la transcripción como procesamiento del pri-miRNA por Drosha-DGCR8. Además estos microRNAs pueden actuar de

forma directa e indirecta sobre las vías de señalización, afectando en cualquiera de los dos casos a la respuesta biológica posterior. Una de las características más interesantes de la mayoría de los fibromiRs, es su participación en bucles de regulación, y en la mayoría de estos casos el microRNA inhibe a un regulador negativo generando la activación de una vía profibrótica [292]. Algunos de los microRNAs relacionados con fibrosis más destacados son miR-1 de carácter antifibrótico implicado en daño cardíaco [293] y miR-21, uno de los microRNAs profibróticos por excelencia que ha sido descrito tanto en pulmón, como en corazón, piel y riñón [294-296]. Finalmente, la familia de miR-29 es un ejemplo de microRNAs reguladores de matriz extracelular, ya que regula de forma directa distintas isoformas de colágeno y otros componentes de matriz [297] y por ello ha sido relacionado con diferentes tipos de fibrosis.

2.10 miR-433

miR-433 se encuentra codificado en el mayor cluster de microRNA descrito [298]. Los microRNAs de este cluster están implicados en un amplio espectro de patologías, especialmente en diferentes tipos de cáncer [298]. Este cluster se encuentra en la región DLK1-DIO3 localizado en el cromosoma 14 humano o en el cromosoma 12 de ratón, siendo además un cluster cuyos genes están sometidos a regulación por impronta genética. Esta región contiene 53 microRNAs en la hebra guía y uno más en la complementaria (Figura 12) [298-300]. Pueden ser regulados por distintos factores de transcripción en bloque o de forma individual a través de su región promotora [301-305].

COPIA

MATERNA

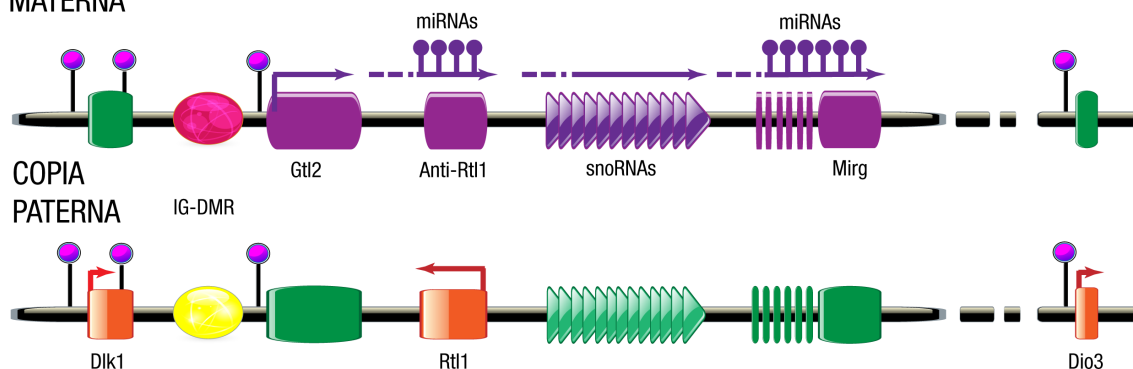


Figura 12: Esquema de los genes codificados en la región DLK1-Dio3. Adaptado de Higuera López, María Ángeles (2014) *Fisiología y fisiopatología del DLK1 en el endotelio vascular*. (Tesis Doctoral).

Aunque el miR-433 no ha sido relacionado con el estrés oxidativo ni con patologías relacionadas, si lo está con traumatismo cerebral, lupus, cáncer de ovario, cáncer de

Introducción

mama, tumores gástricos infecciones adenovirales, fibrosis renal y condroplasia ligada al cromosoma X [305-314]. Algunas de sus dianas validadas aparecen en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3: Dianas validadas para miR-433

microRNA	GEN	REFERENCIA
hsa-miR-433	FASN	[315]
hsa-miR-433	SFRP2	[301]
hsa-miR-433	IGF1	[315]
hsa-miR-433	WNT5A	[301]
hsa-miR-433	FGF20	[316]
hsa-miR-433	IL6	[129]
hsa-miR-433	NR0B2	[304]
hsa-miR-433	NFKB1	[129]
hsa-miR-433	GRB2	[311]
hsa-miR-433	RELB	[129]
hsa-miR-433	RAB34	[125]
hsa-miR-433	HDAC6	[317]
hsa-miR-433	HLA-G	[318]
hsa-miR-433	NR3C1	[318]
hsa-miR-433	HDAC6	[314]
hsa-miR-433	POMC	[319]
hsa-miR-433	FGFR1	[320]
hsa-miR-433	CCND1	[321]
hsa-miR-433	FGF20	[320]
hsa-miR-433	SNCA	[322]
hsa-miR-433	FGF20	[323]
hsa-miR-433	MEF2A	[301]
mmu-miR-433	Nr3c1	[319]
mmu-miR-433	Snca	[322]
mmu-miR-433	Esrrg	[304]
mmu-miR-433	Wnt3a	[301]
mmu-miR-433	Nr0b2	[304]
mmu-miR-433	Nr0b2	[303]
mmu-miR-433	Grb2	[311]

mmu-miR-433	Mbp	[324]
mmu-miR-433	Lin28	[325]
mmu-miR-433	Ccl3	[315]
mmu-miR-433	Fas	[315]
mmu-miR-433	Il6	[315]

Dentro del cluster Gtl2, miR-433 y miR-127 están situados en el mismo locus génico y su estructura es solapante [302-304]. Además existe un mecanismo regulador común a ambos ya que en su región promotora se puede unir el receptor nuclear gamma (ERRγ) y el receptor huérfano (SHP) [302, 304].

Objetivos



3. Objetivos

1. Estudio de la regulación post-transcripcional de los 3'-UTRs de las subunidades catalítica y moduladora de GCL por microRNAs y validación de los candidatos seleccionados. Estudio del efecto producido por la sobreexpresión o inhibición del miRNA candidato elegido, miR-433, sobre la fisiología celular a nivel de:
 - 1.1. Cambios de expresión génica, respuesta antioxidante, niveles de glutatión y S-glutathionilación.
 - 1.2. Efecto sobre las vías de señalización involucradas en la respuesta a redox y a VEGF.
2. Análisis de los efectos causados sobre la expresión de GCL y miR-433 por estímulos pro-oxidantes como peróxido de hidrógeno, inhibición de la síntesis de GSH con L-BSO o inhibición de la respuesta antioxidante utilizando un siRNA frente al factor de transcripción Nrf2 tanto en un modelo endotelial como en distintos tipos de modelos hepáticos.
3. Efecto de la regulación de GCLc y miR-433 por estrógenos como estradiol y GSK-4716 (agonista de estrógenos) en un modelo endotelial.
4. Análisis de la expresión de miR-433 y GCL y su posible alteración en modelos fisiopatológicos de fibrosis renal y hepática utilizando dos tipos de aproximaciones: obstrucción unilateral del uréter (fibrosis renal) y ligadura del conducto biliar (fibrosis hepática)
 - 4.1. Estudio de reversión *in vitro* utilizando un antagomiR específico para miR-433 en células hepáticas y células de epitelio renal tratadas con la citoquina profibrótica TGF- β .
5. Estudio del papel de miR-433 en un modelo celular hepático murino mediante estrategias de pérdida y ganancia de función de GCLs.
6. Generación y caracterización fenotípica de un modelo murino KO para GCLc específico de endotelio.

Materiales y métodos



4. Materiales y métodos

4.1 Células en cultivo

Las células se mantuvieron en un incubador estándar (37°C, 5% CO₂). Todos los ensayos se realizaron después de mantener las células en medio basal, sin suero fetal bovino (FBS) al menos durante seis horas.

4.1.1 Cultivos primarios

Células endoteliales de aorta bovina (BAEC): Las aortas se obtuvieron a partir de terneras o vacas jóvenes de un matadero autorizado y se transportaron hasta el laboratorio en tampón fosfato (PBS) frío, suplementado con antibióticos (penicilina 100 µg/ml, estreptomicina 100 U/ml, fungizona 50 µg/ml). Las aortas se limpiaron, eliminando tejido adiposo y conectivo, y los vasos intercostales se ligaron. Después de limpiar las aortas con PBS, el vaso se canuló con una solución de colagenasa al 0,03% (Sigma) preparado en medio de Hanks (HBSS) y se incubó a 37° C durante 15 minutos. Las aortas se lavaron con medio RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS, Gibco) y la solución obtenida se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en el mismo medio. Las células se cultivaron en placas cubiertas con una matriz de gelatina al 0,2% (Sigma) en PBS. Las células se utilizaron entre pases 3-7 y se mantuvieron en medio RPMI (Gibco), suplementado con 10% FBS y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco).

Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC): Los cordones se obtuvieron de partos no complicados habidos en el Hospital Ruber Internacional. La vena umbilical se dilató cuidadosamente con una cánula y uno de los extremos del cordón se selló con una pinza hemostática. Se inyectó una solución de colagenasa de tipo I (Sigma) al 0,1% en HBSS a través del cordón utilizando una jeringa. Se selló el cordón en el otro extremo con otra pinza y la solución de colagenasa se distribuyó mediante inversión del cordón 2 o 3 veces. Después de incubarse durante 20 minutos a 37°C, uno de los extremos del cordón, se abrió y se recogió el efluente de la vena en medio completo suplementado con suero. Se centrifugaron las células durante 5 min a 1200 rpm, se resuspendieron en Medio Basal Endotelial-2 (EBM-2, Lonza) suplementado con distintos factores de crecimiento (EGM-2, Lonza). Las células se cultivaron en placas con 0,2% de gelatina en PBS. Las HUVEC se utilizaron en pases 2-5.

Células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC): Estas células se aislaron a partir de ratones de la cepa C57BL6 transgénicos (GCLc (f/f)) o suprimidos para GCLc específicamente en endotelio GCLc (e/+). Tras dislocación cervical se extrajeron los pulmones, se trocearon y se digirieron con colagenasa al 0,1% en HBSS, hasta que se obtuvo una solución homogénea de células. Esta población celular mixta se sometió primero a una selección negativa con el anticuerpo FCsRII/III (CD16/CD32) para eliminar los macrófagos y a otra selección positiva posterior con el anticuerpo ICAM-2 (CD-102). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG unido a bolas magnéticas, para poder capturar las células mediante un imán. Estas células se sembraron sobre una matriz de gelatina al 0,1%, fibronectina (10 µg/ml) y colágeno tipo I (20µg/ml) preparada en PBS 1X y se cultivaron en DMEM:HAM-F-12 (1:1) suplementado con 20% FBS, glutamina (2 mM), heparina, ECGF y 1% penicilina/estreptomicina.

4.1.2 Líneas celulares

Las líneas de hepatoma HepG2 y Huh7 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% FBS, penicilina-estreptomicina al 2%, y L-glutamina y aminoácidos no esenciales.

Las células procedentes de riñón de mono COS-7 se cultivaron en DMEM suplementado con 10% FBS y 2% penicilina-estreptomicina.

Las células epiteliales de riñón humano (Hk2) se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% FBS, penicilina-estreptomicina, L-glutamina, hidrocortisona y una mezcla de insulina-transferrina-selenio.

Las líneas celulares de hepatoma Hepa-V y Hepa-CR17 se corresponden con células estables transfectadas con un vector vacío o vectores de expresión para GCLc y GCLm murinas respectivamente, en el laboratorio de origen [326]. Estas células se cultivaron en medio DMEM/F-12 con 10% Suero-Nu (Collaborative Biomedical Products).

4.2 Transfección transitoria con siRNA o microRNAs

El ensayo de transfección con siRNA, miRNA o antagomiR se llevó a cabo para disminuir los niveles de mRNA de genes de interés, para lo cual se diseñaron dúplex de RNA interferentes apropiados para el silenciamiento.

Los diferentes tipos celulares se sembraron en distintos tipos de placas, dependiendo del ensayo a realizar posteriormente, y se transfectaron 24 horas después cuando las

células habían alcanzado un 70% de confluencia. Para ello se utilizó opti-MEM, lipofectamina 2000 (Invitrogen) y el RNA interferente adecuado a cada ensayo, y se diluyeron en el medio de forma separada durante 5 minutos, para posteriormente añadir la mezcla de opti-MEM-Lipofectamina sobre la mezcla del medio con el ácido nucleico. Esta mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después de 5 horas de transfección, se reemplazó el medio por medio completo. Las células se incubaron un mínimo de 48 horas en medio completo suplementado con 10% FBS, dependiendo del ensayo.

4.2.1 Sobreexpresión con microRNAs sintéticos y transfección de inhibidores.

Para los experimentos de sobreexpresión, se realizaron transfecciones según el protocolo descrito en el apartado anterior, utilizándose distintos precursores de pre-microRNAs (Life Technologies), a una concentración de 40 nM, en un intento de mimetizar el efecto del microRNA maduro en la célula. En todos los experimentos se usó igual concentración de un control negativo para el microRNA (miR-NC) cuya secuencia está dispuesta al azar y no tiene una diana conocida entre los mRNAs.

La inhibición *in vitro* de microRNAs se realizó utilizando antagomiRs (Life Technologies). Estos inhibidores contienen secuencias complementarias al microRNA maduro y al unirse a él bloquean el efecto de éstos sobre sus distintos mensajeros diana. Se utilizaron a una concentración de 40-80 nM, dependiendo del experimento. Paralelamente también se utilizó un antagomiR control (antimiR-NC).

4.2.2 Transfección RNA interferente (siRNA)

Se diseñaron distintos siRNAs para disminuir la expresión de ciertos genes de interés. Para ello se utilizó una herramienta bioinformática que estudia el plegamiento de los ácidos nucleicos y el efecto de RNA reguladores (Sfold). Este programa facilita distintas secuencias de dúplex de RNA frente a un RNA mensajero concreto, teniendo en cuenta la accesibilidad a los posibles sitios de unión, y la termodinámica de esta unión. Las construcciones de los siRNA seleccionados se obtuvieron de Life Technologies. El rango de concentración en los ensayos de transfección fue de 30-40 nM. En todos los experimentos se utilizó un siRNA control que no silencia ningún gen en la célula (siRNA-C) y que también se obtuvo de la misma compañía. Las secuencias utilizadas se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias de siRNA utilizados

mRNA	Secuencia
GCLc	5'- UCAGUAAAUCCCGAUAUGAC -3
Nrf2	5'-GUAAGAAGCCAGAUGUUAATT -3'

4.3 Medidas de especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas se investigó mediante el uso de sondas fluorescentes susceptibles de oxidación. Para ello se utilizó la sonda dihidroetidina (DHE), relativamente específica para el anión superóxido y la sonda dihidro clorofluoresceína (DCF) para detección de ROS general. Las células se trataron en diferentes condiciones experimentales, tras lo cual se incubaron con DHE (5 μ M) o DCF (5 μ M) durante 30 min a 37°C. La cuantificación de la producción de ROS se analizó por citometría de flujo usando los canales FL1 y FL3.

4.4 Determinación de los niveles de GSH y GSSG

4.4.1 Medidas de GSH mediante luminiscencia

Después de que las células endoteliales BAEC o HUVEC se sometieran a transfección o al tratamiento correspondiente, las formas reducida y oxidada de glutatión se midieron utilizando el ensayo GSH-Glo y 2GSH/GSSG (Promega) de acuerdo con el protocolo de la casa comercial. Este ensayo se basa en una detección luminiscente y cuantitativa, resultado de la conversión de un derivado de la luciferina en luciferina. Esta reacción depende de la presencia de glutatión y está catalizada por la glutatión-S-transferasa. La producción de luciferina está acoplada a la reacción catalizada por la luciferasa de luciérnaga (Figura 13). Para la medida de GSSG se siguió el mismo protocolo pero previamente se bloqueó el GSH con N-etilmaleimida (NEM, Sigma) y después se redujo el GSSG a GSH, siendo el resto de los pasos comunes. La luminiscencia se determinó en unidades arbitrarias en un luminómetro de placa.

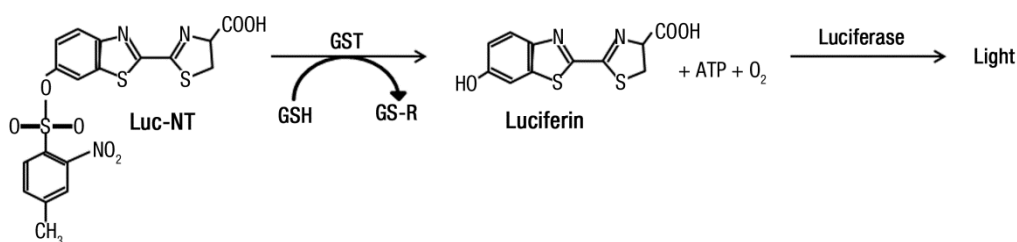


Figura 13: Método GSH-Glo. Reacción de conversión de un derivado de luciferina en luciferina catalizada por la GST y acoplada a la producción de luz generada por la luciferasa de luciérnaga.

4.4.2 Medidas de GSH total mediante fluorimetría con NDA

Para medir GSH total se utilizó también el ensayo con 2,3-Naftalencarboxialdehído (NDA). Para ello se lisaron las células en tampón TES/SB (Tabla 5) y se sonicaron. A 50 μ l de ese lisado se le añadieron 50 μ l de ácido sulfosalicílico (SSA) 200 mM y se incubaron 5 min en hielo, para precipitar la proteína. En una placa de 96 pocillos se añadieron 20 μ l de muestra en triplicado y 10 μ l del agente reductor Tris-(2-carboxietil)-fosfina hidroclicada (TCEP) 50 mM para reducir el GSSG a GSH. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para derivatizar la muestra primero se añadieron 50 μ l de NaOH 0,5 M y después 200 μ l de N-etilmorfolino 0,2 M. La muestra se agitó bien y se añadió un volumen de 10 μ l de NDA (10 mM) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después la placa se midió en un lector multiplaca de fluorescencia a λ_{Ex} 472 nm y λ_{Em} 528 nm. El GSH total se representó interpolando los valores en una recta patrón y normalizándolos frente a la cantidad de proteína total en cada una de las muestras.

Tabla 5: Tampón TES/SB

Concentración	Reactivo
0,25 mM	Sacarosa
20 mM	Tris base
1 mM	EDTA
20 mM	Borato sódico
2 mM	L-Serina

4.4.3 Medidas de actividad de GCLc en HPLC

Para evaluar la actividad de la enzima GCL en presencia de miR-433, se realizó un ensayo de actividad fluorimétrico con monobromobimano (MBB). Para ello se sembraron células HEPA en placas de 10 cm de diámetro y se transfectaron con miR-NC o miR-433. Se sonicaron en 500 μ l de tampón TES/SB frío 10 millones de células transfectadas. Las células lisadas se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm a 4°C. Se prepararon tubos con 20 μ l de muestra para medir la actividad basal. Estos tubos, que contienen 50 μ l de H₂O, 50 μ l de SSA 200 mM y 80 μ l del cóctel de reacción de GCLc (Ver Tabla 6) se mantuvieron en hielo. Otra serie de tubos con 20 μ l de muestra y 80 μ l del cóctel de reacción de GCLc se incubaron en agitación a 37°C. La reacción se inició con un desfase de 30 segundos para cada muestra, añadiendo 50 μ l de L-Cys 5 mM. Pasados 45 min la reacción se paró manteniendo el desfase temporal entre muestras, añadiendo 50 μ l de SSA 200 mM.

Materiales y métodos

Tabla 6: Tampón de reacción de GCLc

Concentración	Reactivo
20 mM	ATP
100 mM	Acido glutámico
1 mM	EDTA
20 mM	MgCl ₂
200 mM	Tris

Para derivatizar las muestras se añadió una solución NEM/KOH de concentración 0,2/0,02 M respectivamente, tamponando el pH en torno a 7,5-8,5. Después se añadieron 20 µl de MBB 25 mM y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado ese tiempo se paró la reacción añadiendo 200 µl de SSA 200 mM.

Para analizar las muestras se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para ello se utilizó una columna C18 de 4 µm de poro y de 4,6x150 mm de tamaño con precolumna (Phenomenex). La fase acuosa utilizada fue tetrabutilamonio fosfato 1 mM y la fase orgánica metanol 100%, utilizando un flujo de 1ml/min. Las condiciones de gradiente se recogen en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7: Gradiente para el programa de análisis por HPLC

Tiempo	% fase acuosa	% fase orgánica
0	95	5
1	80	20
10	70	30
12	40	60
14	40	60
16	95	5
21	95	5

Para calcular la cantidad de γ -GC total formado en la reacción, se calculó la cantidad de GSH obtenida en las muestras incubadas respecto de las muestras basales y se sumó a la cantidad de γ -GC obtenida en las muestras incubadas. La actividad GCLc se representó como nmol/min/ mg de proteína.

4.5 Medidas del ratio redox 2GSH/GSSG mediante infección con adenovirus roGFP2.

El estado redox de la célula fue medido usando un adenovirus que contiene el cDNA para Grx1-roGFP [327, 328]. Las células HUVEC se transfectaron con 40 nM de miRNA control o miR-433, como se describe en el apartado anterior, durante 24 horas. Se infectaron durante 2 horas y se lavaron con PBS y se añadió medio completo fresco. El ratio 2GSH/GSSG se analizó después de 24 horas mediante citometría de flujo. Previamente las muestras se prepararon bloqueando el GSH con NEM 100 μ M durante 5 min a 37 °C, después se fijaron con PFA al 4% a 37°C y durante 5 min, se lavaron con PBS, y se resuspendieron de nuevo en PBS. Las muestras se excitaron a dos longitudes de onda 485 nm (FL1) y 405 nm (FL8). La emisión se midió a 552 nm, para ambas longitudes de onda. El ratio se calculó dividiendo los valores de fluorescencia obtenidos para la forma reducida (485 nm) entre los valores de la forma oxidada (405 nm) según la Ecuación de Nernst (Figura 14).

$$E_{\text{GSH}} = E^{\circ}_{\text{GSH}} - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right) = E^{\circ}_{\text{roGFP}} - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[\text{roGFP}_{\text{red}}]}{[\text{roGFP}_{\text{ox}}]} \right) = E_{\text{roGFP}}$$

$$E_{\text{roGFP}} = E^{\circ}_{\text{roGFP}} - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[1 - \text{OxD}_{\text{roGFP}}]}{[\text{OxD}_{\text{roGFP}}]} \right)$$

$$\text{OxD}_{\text{roGFP}} = \frac{I_{405} * I_{488\text{red}} - I_{405\text{red}} * I_{488}}{I_{405} * I_{488\text{red}} - I_{405} * I_{488\text{ox}} + I_{405\text{ox}} * I_{488} - I_{405\text{red}} * I_{488}}$$

Figura 14: Ecuación del potencial de Nernst para el GSH a partir de los valores de fluorescencia de las formas reducida y oxidada de roGFP.

4.6 Análisis de proteína mediante western blot

El análisis por western blot o inmunoblot es una técnica muy común, utilizada para determinar proteínas, basada en la capacidad de éstas para unirse a un anticuerpo específico generado frente a cada una de ellas [329].

4.6.1 Preparacion de lisados celulares

Obtención de proteína total a partir de lisados celulares: después del protocolo experimental deseado, las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron con 100 µL de tampón de lisis RIPA [50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% deoxicolato sódico, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF e inhibidores de proteasas (Roche, siguiendo las indicaciones del fabricante)]. Los lisados se homogeneizaron pasando las células a través de una jeringuilla de insulina y posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 12.800 rpm. El sobrenadante se recogió y la concentración de proteína se midió mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, Thermo), usando como patrón estándar albúmina de suero bovino (BSA).

Obtención de proteína total a partir de lisado de tejidos: para lisar tejido, se cortó con bisturí una porción del tejido aún congelado, y se añadió a un tubo con 300 µl de tampón RIPA, homogeneizándose de forma mecánica con POLYTRON, manteniendo la muestra siempre en hielo. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 12800 rpm. A partir de estas muestras concentradas, se realizaron diluciones 1:10 y se analizó el contenido en proteína de la manera anteriormente indicada.

4.6.2 Electroforesis SDS-PAGE

Las alícuotas de lisado celular (20-50 µg de proteína) se mezclaron con tampón Laemmli con 2-mercaptoetanol y se hirvieron durante 5 min a 100°C. En el caso de ensayos en condiciones no reductoras el 2-mercaptoetanol no se añadió. Se cargó igual cantidad de proteína en un gel SDS-poliacrilamida de distinto porcentaje según la proteína a detectar y se separaron las proteínas usando el módulo de electroforesis Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). El peso molecular de las mismas proteínas se determinó por comparación con el marcador preteñido que contiene patrones de peso molecular conocido (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad).

4.6.3 Electrotransferencia

Después de la separación por SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) por electrotransferencia. La transferencia de proteína del gel a la membrana se logró, mediante la técnica de transferencia en semi-seco con Trans-blot turbo (Bio-Rad).

4.6.4 Revelado específico de proteínas

Después de la electrotransferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos, incubando la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 3% de leche en polvo, disuelta en tampón Tris salino con Tween al 0,1% (TBS-T). Se incubaron entonces las membranas frente a distintos anticuerpos primarios durante 1 hora o toda la noche a 4°C (Tabla 8). Se lavaron las membranas con TBS-T tres veces (5 minutos cada vez) y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de otros tres lavados, las proteínas se visualizaron utilizando el equipo de infrarrojo Odyssey (LI-COR).

4.7 Ensayo de S-glutationilación de proteínas.

Las HUVEC se cultivaron hasta alcanzar el 70% de confluencia, momento en el que se transfectaron con miR-433 tal como se describió anteriormente. El ensayo de glutathionilación se realizó 48 horas después de la transfección de las células con el microRNA, que se encontraban deprivadas de FBS desde la noche anterior. Las células se trataron con GSNO 50 µM durante 1 hora y posteriormente se incubaron con glutatión-etil-éster biotinilado 25 µM (BIOGEE, Thermo) durante 30 min. Las células se lisaron en tampón RIPA y posteriormente las proteínas glutathioniladas se precipitaron usando estreptavidina-sefarosa (Ultralink-Immobilized Streptavidin Plus,

Materiales y métodos

Pierce) y se analizaron mediante electroforesis en condiciones no reductoras, utilizando un anticuerpo anti-estreptavina (LI-COR).

Tabla 8. Anticuerpos

Antígeno	Descripción	Especie	Proveedor	Nº catálogo	Dilución	Condiciones
GCLc	Policlonal	Conejo	Kavanagh lab		(1:25000)	RT 1h
GCLm	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	sc166603	(1:1000)	RT 1h
Nrf2	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	sc13032	(1:1000)	4°C ON
GSK3β	Monoclonal	Ratón	Cell signaling	9832	(1:1000)	RT 1h
p-GSK3β	Policlonal	Conejo	Cell signaling	9336	(1:1000)	RT 1h
Akt	Policlonal	Rabbit	Cell signaling	9272	(1:1000)	4°C ON
p-Akt (Ser 473)	Policlonal	Rabbit	Cell signaling	9271	(1:1000)	4°C ON
β-actin	Monoclonal	Mouse	Sigma	A1978	(1:15000)	RT 1h
eNOS	Monoclonal	Mouse	BD Transd Lab	610297	(1:1000)	RT 1h
p-eNOS (Ser1177)	Policlonal	Rabbit	Cell signaling	9571	(1:1000)	4°C ON
GSH	Monoclonal	Ratón	Virogen	101-A	(1:1000)	4°C ON
NitroTyr	Policlonal	Conejo	Millipore	06-284	(1:1000)	4°C ON

4.7.1 Inmunoprecipitación de eNOS-S-glutacionilada

Para estudiar el nivel de S-glutacionilación de eNOS ésta se inmunoprecipitó de forma específica. Para ello se transfectaron HUVEC al 70% de confluencia, según se describe en el apartado 4.5, con miR-433 o su respectivo control (miR-NC). Tras 48 horas de transfección, las células se cultivaron durante un mínimo de 6 horas con medio basal, y posteriormente se trataron con GSNO 50 µM durante 1 hora. Las células se lisaron en tampón de lisis RIPA y 60 µg del lisado total se incubaron con 0,25 µg en un volumen final de 50 µl durante 2 horas, en agitación a 4°C. Tras esta incubación se añadió 50 µl de proteína A/G sefarosa equilibrada en tampón de lisis

1:1, y se incubó durante 2 horas en agitación a 4°C. Tras este período los lisados se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min, y se recuperó la fracción no unida. La proteína unida a la sefarosa se lavó con tampón de lisis 3 veces, para eliminar uniones no específicas, se eluyó en tampón de carga Laemmli 1X y se analizó mediante western blot frente a GSH y a eNOS.

4.8 Apoptosis

Para determinar el grado de apoptosis se utilizó el ensayo de activación de caspasa-3 mediante inmunofluorescencia. Para ello se sembraron HUVEC sobre cubres en placas de 24 pocillos. Se transfectaron durante 48 horas con miR-433 según lo indicado en el apartado 3.5. Después del protocolo experimental las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS y se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,025%. Las células se bloquearon con FBS al 3%. El anticuerpo primario para caspasa-3 activa se preparó en una dilución 1:200 en FBS al 3% y se incubó en cámara húmeda durante la noche a 4°C. Las células se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488 (Molecular probes) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (1 µg/ml) durante 5 min, después de lavar el anticuerpo secundario con PBS. Las células se montaron en portaobjetos y se analizaron usando un microscopio Olympus DSU.

4.9 PCR cuantitativa a tiempo real

4.9.1 Aislamiento de RNA total y microRNA

Se extrajo RNA total y microRNAs de células en cultivo y tejido, utilizando el kit miRNeasy MiniKit (Qiagen), basado en extracción con Quizol/cloroformo y purificando mediante columnas. El contenido y pureza del RNA se analizó en el nanodrop (Thermo).

4.9.2 Transcripción reversa

Para realizar la transcripción reversa de RNA mensajero a DNA complementario se usó el kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad). La reacción se llevó a cabo con 1 µg de RNA total, en un volumen final de 20 µl siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Tabla 9).

Materiales y métodos

Tabla 9: Protocolo para transcripción reversa

Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
5	25
30	42
5	85
Mantenimiento final	4

4.9.3 PCR a tiempo real

Para analizar la expresión génica a partir de este cDNA se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real, usando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de las secuencias disponibles en bases de datos, con el software Primer3 (

Tabla 10) y sintetizados por Sigma. La PCR realizada se basó en tecnología Sybr Green (Bio-Rad) y se realizó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad) según el protocolo recogido en la Tabla 11.

Tabla 10: Oligos para PCR

Primer	Secuencia
Hsa Nrf2 F	AGTGGATCTGCCAACTACTC
Hsa Nrf2 R	CATCTACAAACGGGAATGTCTG
Hsa, Bta, Mmus GCLc F	CCTCCAGTTCCTGCACATCT
Hsa, Bta, Mmu GCLc R	GGGTAGGATGGTTTGGGTTT
Hsa GCLm F	AATCTTGCCCTCCTGCTGTGT
Hsa GCLm R	TTCACAATGACCGAATACCG
Hsa GAPDH F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
Hsa GAPDH R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
Mmus Nrf2 F	CTACTCCCAGGTTGCCCA
Mmus Nrf2 R	CGACTCATGGTCATCTACAAATGG
Mmus GCLm F	TGTGTGATGCCACCAGATTT
Mmus GCLm R	GATGATTCCCCTGCTCTTCA
Mmus Fibronectin 1 F	ACCGACAGTGGTGTGGTCTA
Mmus Fibronectin 1 R	CACCATAAGTCTGGGTCACG
Mmus TGFb1 F	AGCGGACTACTATGCTAAAGAGGTCAACCC
Mmus TGFb1 R	CCAAGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTATA
Hsa, Bta, Mmu GAPDH F	GCCTGGTCACCAGGGCTGC
Hsa, Bta, Mmu GAPDH R	CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATGG

Tabla 11: Protocolo PCR

Paso	Tiempo	Temperatura (°C)
1	3 min	95
2	10 s	95
3	30 s	60
4	Volver a paso 2 (x39)	

4.9.4 PCR de microRNAs

El RNA de las muestras se llevó a una dilución de 5 ng/μl cuando se utilizó el kit de síntesis Universal cDNA Synthesis II (Exiqon) basado en una retrotranscripción que utiliza un adaptador poly-T (Figura 15) o a 2 ng/μl cuando se utilizó el protocolo de TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) basado en una transcripción reversa que utiliza un oligonucleótido específico para cada microRNA en forma de horquilla (Figura 15). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante y los tiempos y temperaturas utilizados recogidos en las Tablas 12 y 13.

Una vez obtenido el cDNA, para la mayoría de los experimentos *in vitro*, primero se realizó una dilución 1:80 y después se prosiguió con la PCR a tiempo real. Se usaron oligonucleótidos específicos para cada microRNA maduro modificados con ácidos nucleicos bloqueados (tecnología LNA™, Exiqon), combinados con SYBR Green (Bio-Rad).

Tabla 12: Protocolo termociclador para transcripción reversa Taqman.

Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
30	16
30	42
5	85
Mantenimiento final	4

Tabla 13: Protocolo termociclador para transcripción reversa Exiqon

Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
60	42
5	95
Mantenimiento final	4

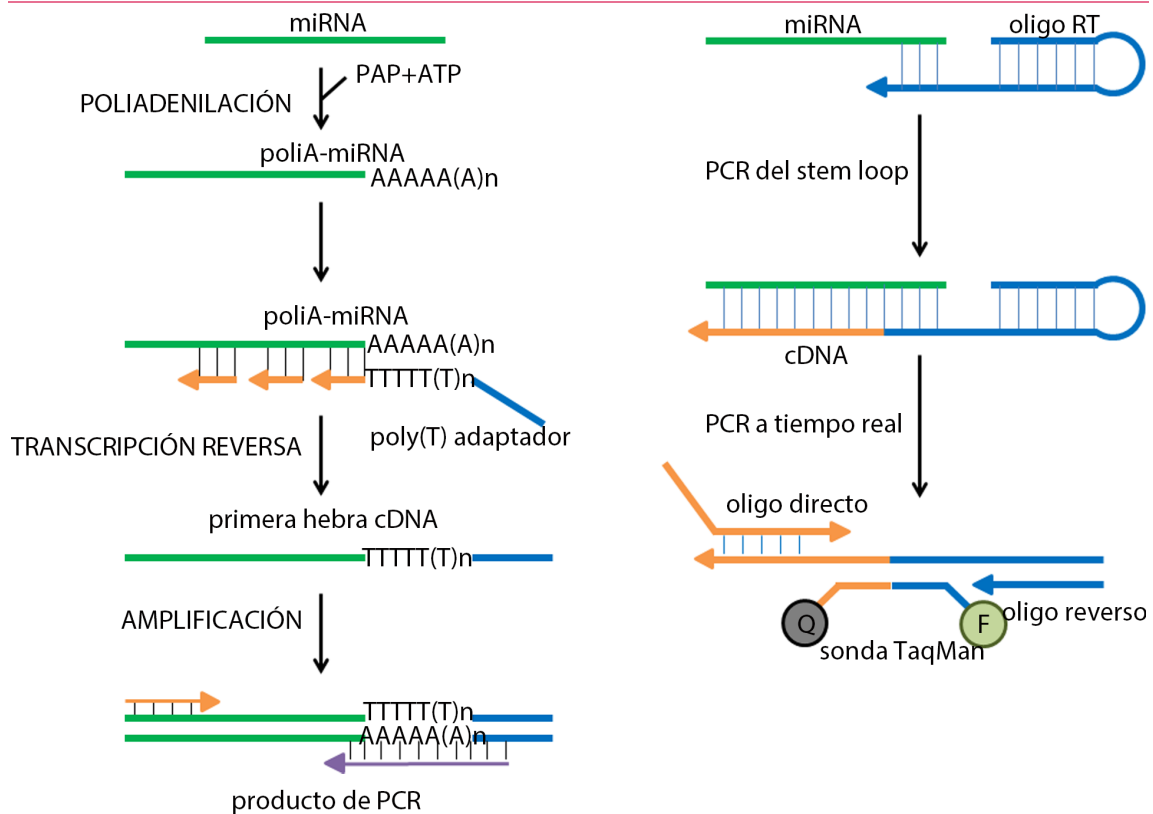


Figura 15: PCR de microRNAs. A) PCR de EXIQON con adaptador poli-T. (B) PCR Taqman con retrotranscripción con oligonucleótido específico para cada microRNA.

Para los experimentos *in vivo*, no se necesitó diluir el cDNA y se utilizaron sondas TaqMan específicas para cada microRNA (Applied Biosystems), en estas PCRs se utilizó TaqMan Universal PCR master mix 2X, no UNG (Applied Biosystems).

4.9.5 Análisis de resultados por el método $\Delta\Delta Ct$

El análisis de los resultados de expresión relativa de los distintos genes estudiados se realizó utilizando los valores del ciclo umbral (Ct) obtenidos y analizándolos según el método $\Delta\Delta Ct$ [330], según la ecuación de abajo. Como control interno se utilizó el gen que codifica para GAPDH en el caso de mRNAs y el RNA nuclear U6 para los microRNAs.

$$\text{Expresión gen} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen x}} - Ct_{\text{gen control}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condición x}} - \Delta Ct_{\text{condición control}}$$

Figura 16: Método de cálculo de expresión génica $\Delta\Delta Ct$.

4.10 Ensayos de actividad luciferasa con 3'-UTR

4.10.1 Plásmido psiCHECK2 (Promega)

Este vector fue empleado en ensayos de actividad luciferasa en células de mamífero para generar una construcción híbrida con el RNA mensajero de la luciferasa de *Renilla* y el 3'-UTR de interés. También incluye una secuencia codificante para la proteína luciferasa de luciérnaga, que se usa para normalizar los niveles de transfección en los ensayos.

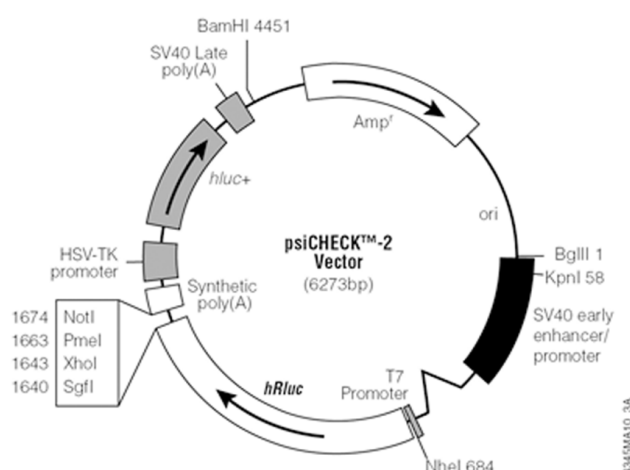


Figura 17: Mapa del plásmido psiCHECK2.

4.10.2 Clonaje de las construcciones de 3'-UTR en el vector psiCHECK2

Para analizar la interacción de microRNAs con sus posibles dianas se clonaron los distintos fragmentos 3'-UTRs en el plásmido psiCHECK2. Los fragmentos de DNA correspondientes a las regiones 3'-UTRs de GCLc y GCLm se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico obtenido de células humanas o bovinas con oligonucleótidos específicos para estas regiones (Tabla 14) que en sus extremos tienen sitios de restricción para las enzimas de restricción *Not I* y *Xho I*, con el fin de clonarlos de manera direccional en el vector tras la región codificante para el gen de la luciferasa de Renilla. Todas las construcciones se secuenciaron para comprobar que contenían la secuencia adecuada. Los oligonucleótidos utilizados para estas construcciones se recogen en la Tabla 14.

Tabla 14: Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los fragmentos 3'-UTRs

Primer	Secuencia
Hsa GCLc F	AACTCGAGACATTCTACAGAAAGAAAAATGCATTATTGACGAA
Hsa GCLc R	AGGCGGCCGCCTG AAT GAA AGC TAA TTC CAT TCT TTT ATT TCC TC
Hsa GCLm F1	AACTCGAGCTGACTTAGGAGCATAACTTAC
Hsa GCLm R1	AGGCGGCCGCAAA TAT CTT CTT CCA GTA TTT CAG TTT TAA
Hsa GCLm F2	AACTCGAGCTTAGTTGCTAATGTATCTAAACTT
Hsa GCLm R2	AGGCGGCCGCAAGG CTC CAC TGT ATT TT
Bta GCLc F	TCGAGCACCTGCAGGACGAGAAG
Bta GCLc R	GGCCGCAATCCACCACCATCCGATTA

4.10.3 Construcción de mutantes puntuales de los sitios de unión de microRNAs.

Las mutaciones puntuales en las regiones de unión del microRNA a los diferentes 3'-UTRs se generaron utilizando el kit Multisite-QuikChange directed mutagenesis (Stratagene) de acuerdo al protocolo del fabricante, basado en una PCR con la enzima *Pfu* y unos oligonucleótidos que contienen los cambios de bases correspondientes a las mutaciones (Ver tabla 12). Cuando la PCR finalizó el producto se digirió con enzima de restricción *DpnI* para eliminar la construcción original modificada por metilación. Este producto se transformó en bacterias *E.Coli* DH5 α . Tras crecer las bacterias en LB-agar y seleccionar colonias las construcciones mutantes se comprobaron mediante secuenciación. Los oligonucleótidos utilizados para mutar estas construcciones se recogen en la Tabla 15.

Tabla 15: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida

Primer	Secuencia
Hsa GCLc PM1 F	TATTTTGGATTAACAATGTATTTTAATAACATATCTAAAGTCATGTTGAA CTGGCTTGTACATTTTAAATTC
Hsa GCLc PM1 R	GAATTTAAAAATGTACAAGCCAGTTCAACATGACTTTAGATATGTTATT AAAATACATTGTTAATCAAAAATA
Hsa GCLc PM2 F	ACTGCTTACTTTCTCTATAAACTCATCAATAAATGTTGAAAGGCACTG AGTTTT
Hsa GCLc PM2 R	AAAACTCAGTGCCTTTCAACATTTATTGATGAGTTTTATAGAGAAAGTA AGCAGT
Hsa GCLm PM2 F	GGCTGATGTTACATCTTTTTTTCAACAACTATCAGAATATAGTGAACA CTT
Hsa GCLm PM2 R	AAGTGTTCACTATATTCTGATAGTTGTTGAAAAAAGATGTGAACATCA GCC

4.10.4 Ensayo de actividad luciferasa

Las células COS-7 se sembraron en una placa de 12 pocillos. Cuando alcanzaron el 70% de confluencia se transfectaron con 150 ng del pSICHECK2-3'UTR correspondiente y con el microRNA o antagomiR deseado (40nM), siempre llevando en paralelo un control experimental con miR-NC o bien con antagomiR-NC, siguiendo el protocolo de transfección anteriormente descrito. Tras 24 horas de transfección las células se lisaron con 125 µl de tampón de lisis pasivo. La actividad luciferasa se midió utilizando el sistema Dual-Glo luciferase assay system (Promega). En este caso se normalizó la actividad luciferase de frente a su correspondiente actividad luciferasa de luciérnaga y se expresó como porcentaje del control. Los ensayos se llevaron a cabo en triplicados intra-experimentales.

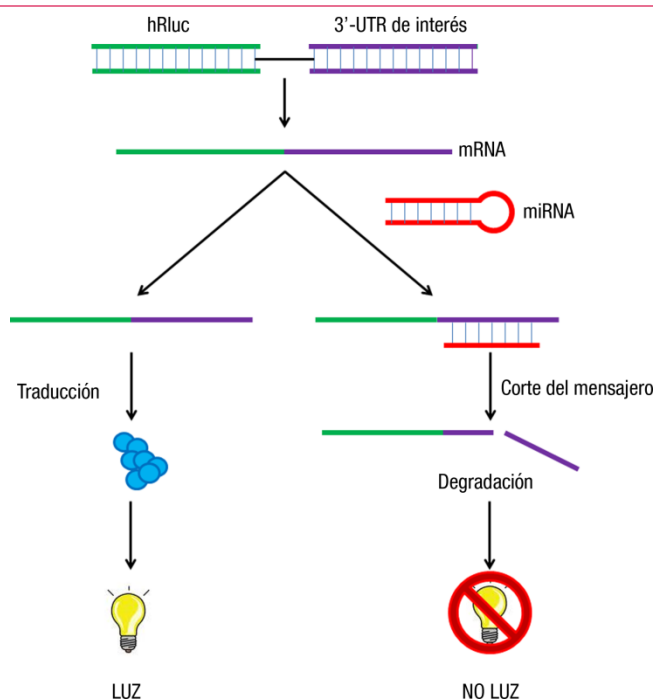


Figura 18: Funcionamiento del ensayo luciferasa con el plásmido pSICHECK2 en presencia de un microRNA.

4.11 Modelos animales

Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo a la normativa Internacional vigente (Real Decreto 53/2013, BOE núm. 34 LEY 32/2007) y se aprobaron por el comité ético de la institución en la que se realizaron. Para los modelos murinos se utilizaron ratones de la cepa C57BL6 (obtenidos de Charles River). Después de la recepción de los animales, éstos se mantuvieron en jaulas ventiladas para minimizar el riesgo de infección por patógenos.

4.11.1 Ligadura del conducto biliar

Un grupo de 24 ratones de 3 meses de edad se anestesió con una inyección intraperitoneal de Ketamina (80mg/kg) y Xilacina (10mg/kg). El conducto biliar se expuso mediante una incisión en la línea media abdominal y se practicó una doble ligadura a 1 cm de su desembocadura en el duodeno, utilizando hilo de seda (7/0) no reabsorbible, seguida de transección. Se realizó también una operación simulada (sham) en una serie de 6 ratones que fueron sometidos a cirugía sin ligación [54]. Los animales se sacrificaron 1, 7, 14 y 21 días después de la cirugía. El hígado se congeló en nitrógeno líquido para estudiar tanto los niveles de RNA como de proteína.

4.11.2 Obstrucción unilateral del uréter

El modelo se realizó según el protocolo previamente descrito [331]. Posteriormente se procedió a la ligadura del uréter izquierdo con un hilo de sutura (4/0) no absorbible, en dos puntos suficientemente separados con el fin de prevenir la infección del tracto urinario. Por último se realizó un corte entre ambas ligaduras (riñón obstruido). Como control adicional se utilizó el riñón que no ha sufrido cirugía (riñón contralateral). Los ratones se sacrificaron a los 5, 10 y 15 días después de la cirugía.

4.11.3 Reactividad vascular

Para estudiar la reactividad vascular se utilizaron arterias mesentéricas de ratón utilizando un miógrafo de vasos pequeños para medir la tensión isométrica [332] [333]. Los animales se sacrificaron mediante exposición a dióxido de carbono hasta que quedaron inconscientes e inmediatamente se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación, se extrajo el mesenterio. Este tejido se lavó en solución fisiológica Krebs-Henseleit (KHS) a 4 °C, para mantenerlo en condiciones fisiológicas y limpiar los restos de sangre. Se diseccionó la arteria mesentérica principal y se limpió la grasa y el tejido conectivo adherido. Se obtuvieron segmentos arteriales, de aproximadamente 300 μm de diámetro, que fueron montados en el miógrafo en continuo burbujeo con una mezcla de carbógeno (95% O_2 y 5% de CO_2) para asegurar un pH entre 7,3 y 7,4. Para cada segmento se determinó su diámetro interno y la tensión basal óptima, considerada como el 90% de la obtenida cuando se sometía a una presión transmural de 100 mm Hg. Se ensayó su viabilidad exponiéndolos a KCl 125 mmol/l. Las arterias se preincubaron o no durante 20-30 min con HB_4 (10^{-5}M) o con NAC (10^{-5}M). Los vasos se incubaron con NA (1 $\mu\text{mol/L}$) y cuando la contracción fue estable se realizaron los ensayos de vasorelajación. Las arterias se sometieron a concentraciones crecientes de acetilcolina (ACh) en la relajación dependiente de endotelio en concentraciones crecientes desde 1 nmol/L a 3 $\mu\text{mol/L}$. También se expusieron a nitroprusiato sódico (SNP) en un rango de concentraciones de 1 nmol/L a 3 $\mu\text{mol/L}$, con el fin de determinar el grado de vasodilatación independiente de endotelio.

4.12 Análisis estadístico

Todos los gráficos de barras que aparecen en este trabajo están representados como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism Software versión 5. Las diferencias estadísticas entre diferentes grupos, con

Materiales y métodos

una única condición experimental se compararon utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis con un post-test de Dunn. El método de Anova de dos vías con corrección de Bonferroni se utilizó cuando se estudiaron las diferencias entre grupos expuestos a más de una condición experimental. Las diferencias entre dos únicos grupos se analizaron con Mann-Whitney. Un valor p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados



5.Resultados

5.1 Identificación y confirmación de miR-433 como miRNA candidato para la regulación de GCLc y GCLm

5.1.1 Análisis bioinformático

El análisis *in silico* de los 3'-UTR de los genes humanos de GCLc y GCLm con distintas bases de datos como targetscan.org o miRwalk.org proporcionó una lista de microRNAs candidatos que mostraban sitios potenciales de unión complementarios a estas secuencias (Figura 19). Entre todos estos candidatos seleccionamos miR-144 y miR-433 como los candidatos más interesantes. El microRNA miR-144 ha sido previamente descrito como microRNA regulador de Nrf2, y por tanto como un microRNA sensible al estado redox en anemia falciforme y como regulador en enfermedades neurodegenerativas [263, 276]. Por el contrario miR-433 no ha sido descrito previamente en patologías relacionadas con estrés oxidativo, y contiene dos sitios de unión en cada uno de los 3'-UTR de cada subunidad de GCL. Por ello se centró el estudio de manera mayoritaria en la caracterización de la posible regulación de GCL por miR-433.

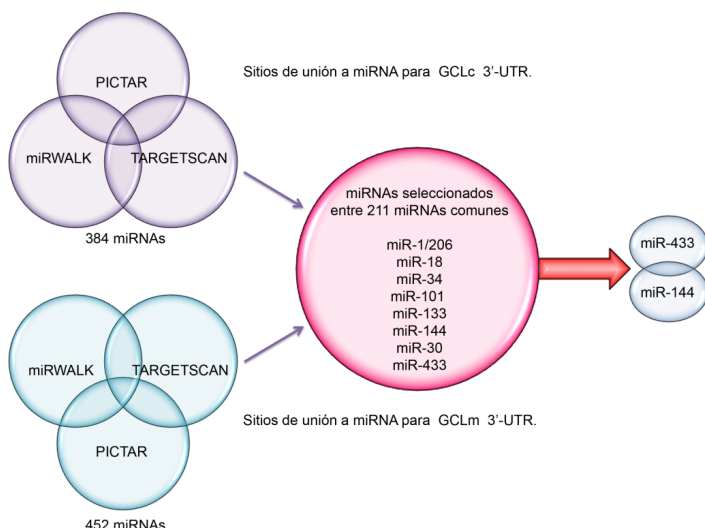


Figura 19: Predicción *in silico* de los microRNAs reguladores para ambas subunidades de GCL mediante el análisis de la secuencia de los 3'-UTR humanos. Utilizando tres bases de datos diferentes, Targetscan, miRwalk y PICTAR, se identificaron los microRNAs comunes a ambas 3'-UTRs. Entre estos los microRNAs con mejor "score", fueron miR-433 y miR-144 que se seleccionaron finalmente como candidatos.

El 3'-UTR humano de GCLc tiene 1.414 pares de bases. Los dos sitios de unión descritos para miR-433 se encuentran situados en los extremos de esta región (Figura 20A). El primero de estos sitios es un 8-mer, que sólo se encuentra conservado en

humanos. El segundo sitio de unión es un sitio 7-mer conservado entre varias especies de mamíferos. El 3'-UTR humano para GCLm es casi dos veces más largo que el de la subunidad catalítica y contiene también dos sitios de unión para miR-433 (Figura 20B).

Para verificar el comportamiento funcional de la posible unión de este microRNA, los fragmentos 3'-UTRs de ambas subunidades fueron clonados en un vector reportador de luciferasa. Para GCLc se utilizaron una construcción silvestre y dos construcciones mutantes, PM1 (C240G y A241U) y PM2 (incluyendo PM1 + C1204G y A1205U). La mutación puntual 1 (PM1) es un cambio de dos bases en la primera de las dos regiones *seed* (posición 237-244) mientras que la mutación en el sitio 2 (PM2) contiene ambas secuencias en las mismas bases (posiciones 237-244 y 1002-1009). La sobreexpresión de miR-433 fue capaz de disminuir la actividad luciferasa aproximadamente en un 50%. Esta inhibición de la actividad fue parcialmente revertida con la construcción GCLc PM1 y completamente abolida utilizando GCLc PM2 (Figura 21).

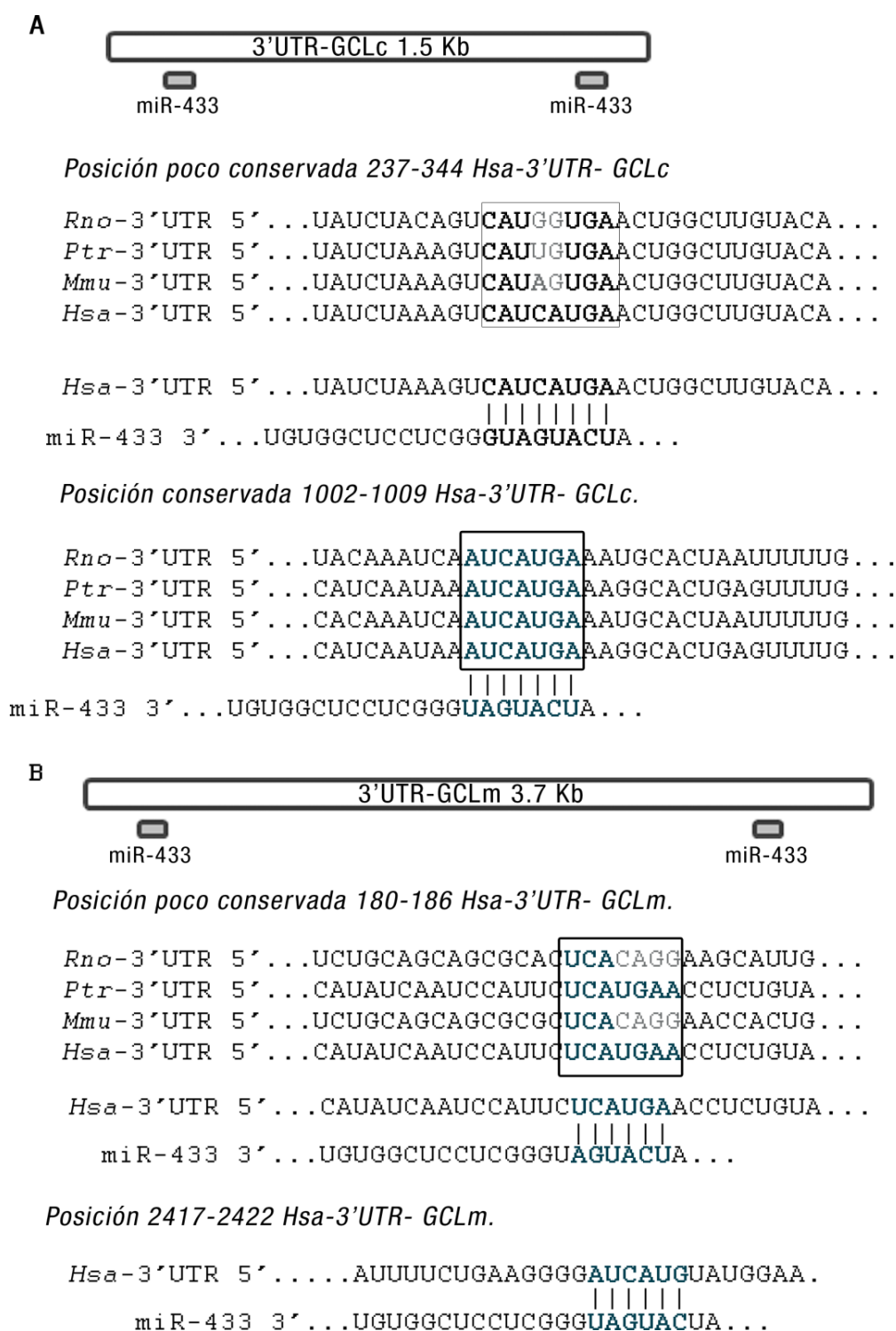


Figura 20: Esquema de los fragmentos de 3'-UTRs de los mRNA GCLc y GCLm. A) El 3'-UTR de GCLc 3'-UTR tiene 1.414 bases de largo y contiene dos secuencias seed para miR-433 (indicado arriba). El primer sitio (poco conservado) se encuentra sólo en humanos y el segundo es un 8-mer conservado en varias especies de mamíferos. B) el 3'-UTR de la subunidad moduladora tiene 3,7 kb y también contiene dos sitios de unión, uno en el inicio y otro al final de la secuencia. El primero está poco conservado entre especies y el segundo sólo está presente en humanos. Hsa (*Homo sapiens*), Ptr (*Pan troglodytes*), Mmu (*Mus musculus*), Rno (*Rattus norvegicus*).

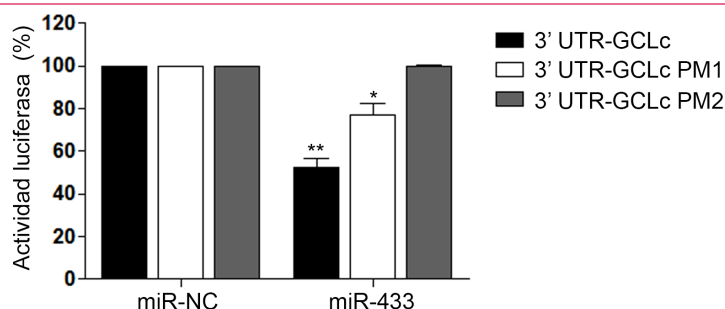


Figura 21: miR-433 se une a la región 3'-UTR de GCLc. El ensayo de actividad luciferasa con el 3'-UTR de GCLc se llevó a cabo en células COS-7. Estas células se transfectaron con las respectivas construcciones de psiCHECK2-3'-UTR (125 ng) o sus versiones mutantes y miR-433 (40 nM) durante 24 horas. El diagrama de barras representa la actividad luciferasa relativa del 3'-UTR de GCLc referido a las células transfectadas con el control negativo (miR-NC). La mutación puntual 1 (PM1) es un cambio de dos bases en la región seed (posición 237-244) para miR-433. El mutante PM2 contiene ambas secuencias seed mutadas en las mismas bases (posiciones 237-244 y 1002-1004). Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al control.

Para el análisis de GCLm se probaron tres tipos de construcciones distintas denominadas GCLmS1 (180-186), GCLmS2 (2417-2422) y GCLm S2 PM (C2419G y A2420U). En este caso miR-433 fue capaz de inhibir la actividad en un 35%, solamente en la construcción GCLm S2. La mutación de este sitio funcional en la secuencia seed para miR-433 GCLm S2 PM), sólo redujo la actividad luciferasa en un 20% (Figura 22).

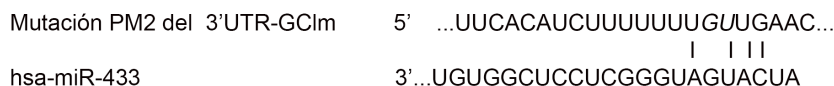
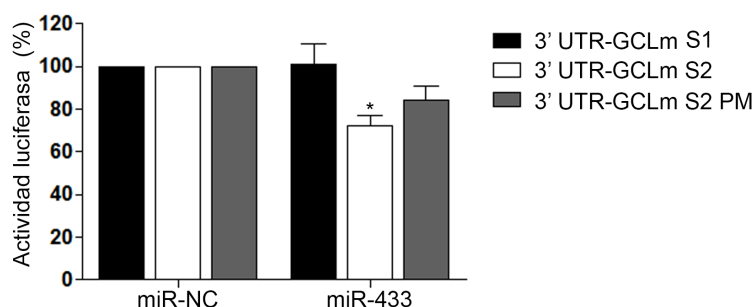
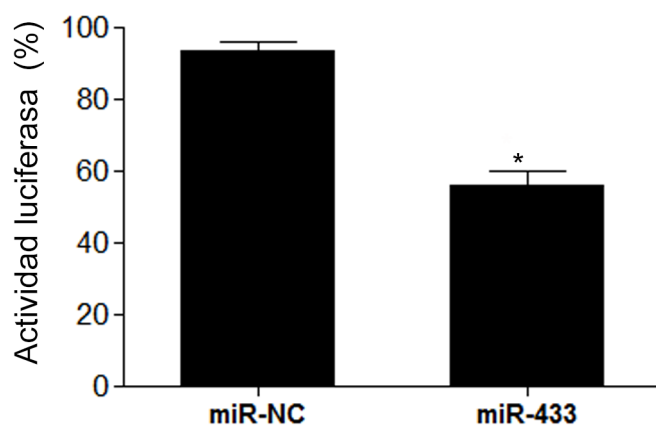


Figura 22: miR-433 se une a la región 3'-UTR de GCLm. El ensayo de actividad luciferasa con el 3'-UTR de GCLm se llevó a cabo en células COS-7. Estas células se transfectaron con las respectivas construcciones de psiCHECK2-3'-UTR (125 ng) o sus versiones mutantes y miR-433 (40 nM) durante 24 horas. El gráfico de barras representa la actividad luciferasa relativa del 3'-UTR de GCLm referida al control negativo (miR-NC). El sitio 1 para GCLm (S1) es una secuencia de 1 kb que contiene el primer sitio de unión para miR-433 (posición 180-186). El sitio 2 (S2) es una construcción de 1 kb que contiene el segundo sitio de unión para miR-433 (posición 2417-2422). La construcción mutante 2 (S2 PM) contiene un cambio de dos bases respecto al sitio 2. Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Se observaron resultados similares también en la región 3'-UTR del mRNA bovino de la subunidad catalítica de GCLc, que sólo conserva el segundo sitio de unión (Figura 23A). La sobreexpresión de miR-433 en células transfectadas con el vector reportador de luciferasa del 3'-UTR de GCLc también disminuye su actividad significativamente en un 40% (Figura 23B). Además se utilizó el inhibidor de miR-433, no observándose ningún cambio con ninguna de las concentraciones estudiadas.

A



B

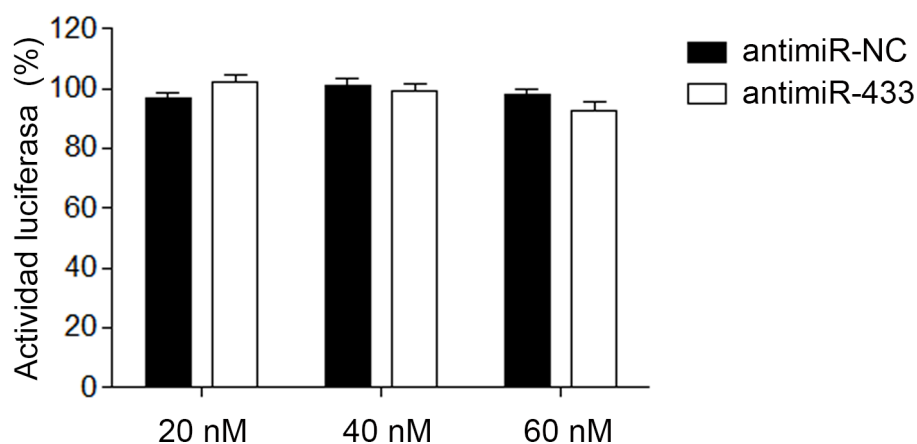


Figura 23: Efecto de miR-433 sobre el 3'-UTR bovino de GCLc. Se transfectaron células Cos-7 con la construcción del plásmido reportador de luciferasa que contenía el 3'-UTR de GCL bovino (125 ng) y miR-NC o miR-433 (40nM, 24 h). El gráfico de barras representa la media \pm SEM de la actividad luciferasa referida al control. (B) Las Cos-7 se transfectaron con 125 ng de la construcción Bta-3'-UTR-GCLc y el inhibidor de miR-433 (anti-miR-433) y su control (anti-miR-NC) durante 24 h, a las concentraciones indicadas en la figura. El gráfico representa los valores de la media \pm SEM de la actividad luciferasa, * $p < 0,05$ respecto al control.

5.1.2 miR-433 disminuye los niveles de la expresión de proteína de GCLc y GCLm

Para evaluar el efecto de miR-433 sobre GCL en un modelo endotelial *in vitro*, transfectamos células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con el microRNA sintético maduro miR-433 o miR-144 o un control negativo (miR-NC). La sobreexpresión de miR-433 indujo una disminución significativa sobre los niveles de proteína de ambas subunidades de GCL, mientras que ese efecto no fue detectable en las células transfectadas con miR-144 (Figura 24A). En concordancia con estos resultados, la expresión de los mRNA para GCLc y GCLm también disminuyó cuando miR-433 se sobreexpresó (Figura 24B).

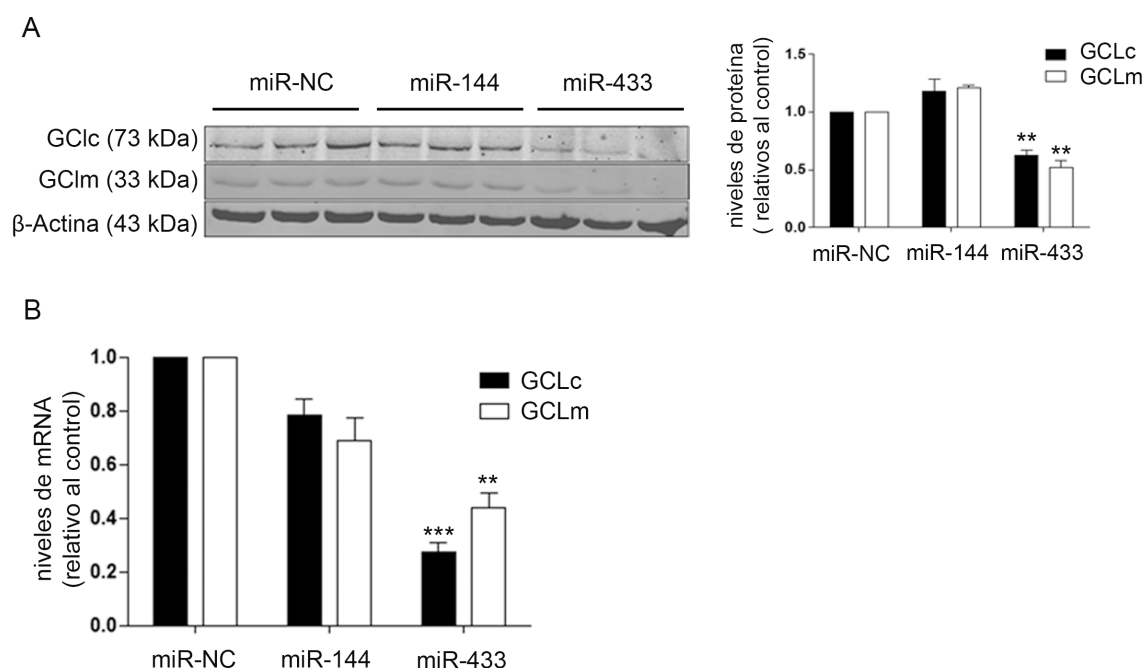


Figura 24: miR-433 disminuye la expresión de ambas subunidades de GCL. A) Las células HUVEC se transfectaron con 40 nM de miRNA control, de miR-433 o de miR-144 y se lisaron 48 horas después de la transfección. Los niveles de proteína de GCLc y GCLm (30 μ g) se analizaron mediante inmunoblot. En la figura se muestra un blot representativo y los valores de la media \pm SEM del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes después de la corrección por β -actina. B) El gráfico de barras representa la media \pm SEM de los niveles de mRNA de GCLc y GCLm determinados por qPCR después de 48h de transfección con un control negativo (miR-NC, 40 nM), miR-144 (40 nM) o miR-433 (40 nM), $n \geq 3$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a su correspondiente control.

Para evaluar si la inhibición de miR-433 endógeno tenía efecto sobre la expresión de la enzima GCL, se transfectaron también células HUVEC con los correspondientes antimiR, utilizando un control negativo (antimiR-NC) o el correspondiente inhibidor de miR-433 (antimiR-433). La inhibición de miR-433 en este modelo celular en

condiciones basales no fue suficiente para aumentar los niveles de expresión de las proteínas GCLc o GCLm (Figura 25).

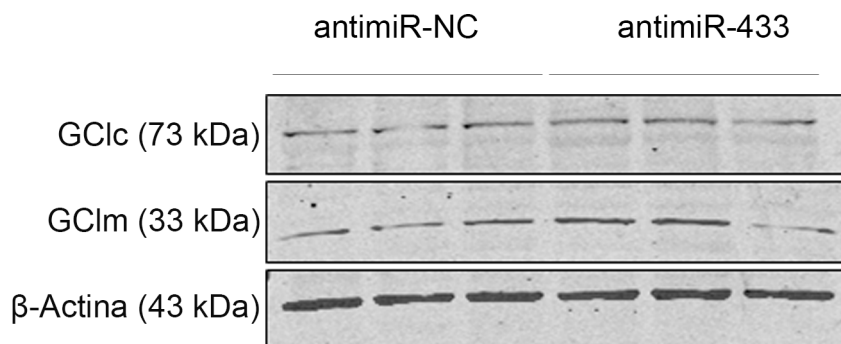


Figura 25: La inhibición de miR-433 no altera los niveles de expresión de GCL. Se transfectaron células endoteliales humanas con 80 nM de antagomiR control (anti-miR-NC) o el correspondiente inhibidor de miR-433 (anti-miR-433) durante 48 horas. Los niveles de proteína de GCLc y GCLm (30 µg) se analizaron mediante inmunoblot. La figura muestra un blot representativo.

Para estudiar si el efecto de la sobreexpresión de miR-433 sobre GCL era detectable en presencia de estímulos oxidantes, tratamos células HUVEC con H_2O_2 durante diferentes períodos de tiempo, en presencia o ausencia de miR-433. Tal y como era esperable, la exposición a miR-433 se asoció con una inhibición del aumento de expresión de GCLc y GCLm generado por el tratamiento con H_2O_2 (Figura 26).

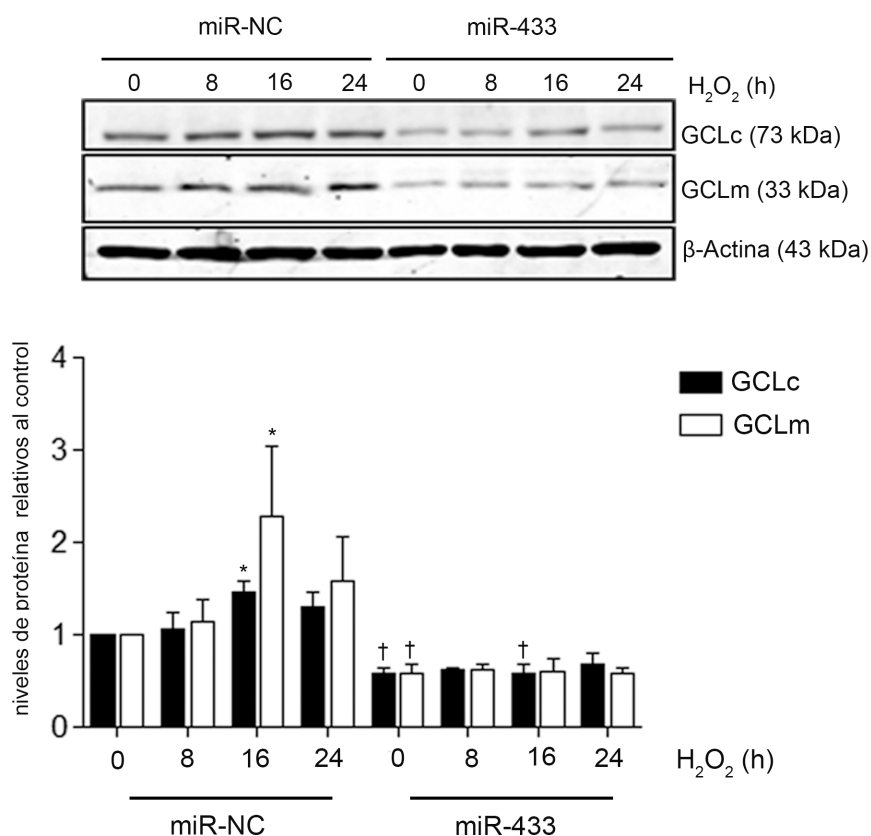


Figura 26: La inhibición de GCL mediada por miR-433 se mantiene después de la exposición a H_2O_2 . Las HUVEC transfectadas con miR-NC o miR-433 (40nM, 48 h) se mantuvieron en medio sin FBS al menos durante 6 horas y después se trataron con 200 µM H_2O_2 . El gráfico representa el análisis densitométrico del efecto de H_2O_2 a distintos tiempos (media±SEM, n≥3), *p<0,05; respecto a su control y † p<0,05 respecto a su tiempo correspondiente.

Resultados

Además también se estudiaron los niveles de expresión de GCLc en otro modelo de células endoteliales, en este caso de origen bovino (bovine aortic endothelial cells, BAEC). En BAEC se transfectaron distintos microRNAs candidatos para el 3'-UTR de GCLc y entre ellos miR-433. Como se observa en la Figura 27 miR-433 fue capaz de inhibir tanto la expresión de proteína como de mRNA de GCLc también en esta especie.

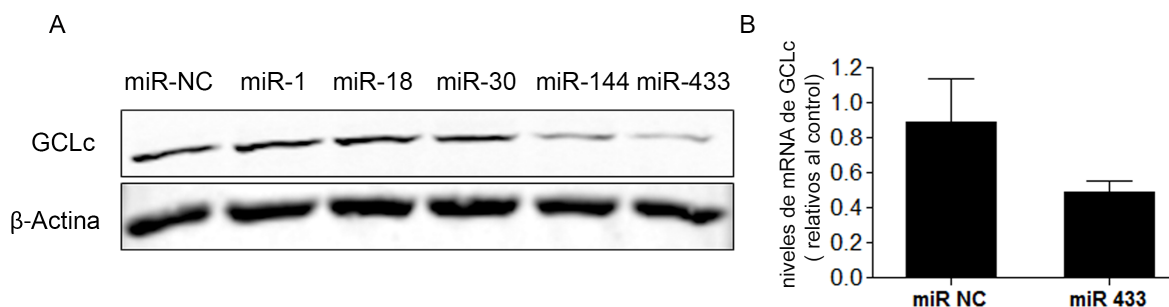


Figura 27: Efecto de la sobreexpresión de distintos microRNAs en BAEC. Las células BAEC se transfectaron con los microRNAs indicados (40 nM, 48h). A) El western blot es representativo de la expresión de GCLc en estas condiciones. B) El gráfico representa los valores media \pm SEM del análisis de la sobreexpresión de miR-433 mediante qPCR de GCLc.

EL factor de transcripción Nrf2 juega un papel fundamental en la respuesta antioxidante [334]. Se han descrito distintos microRNAs que interfieren con la vía de Nrf2-Keap1-Bach-ARE [95, 268, 334]. Entre ellos cabe destacar miR-144 que además disminuye la expresión de GCL por un mecanismo dependiente de Nrf2 tanto en neuronas [263] como en eritrocitos [276]. En este contexto nos preguntamos si el efecto inhibitorio de miR-433 que observamos sobre GCL en las células endoteliales estaba mediado también por Nrf2. Para confirmar o descartar esta posible regulación de GCL dependiente de Nrf2, determinamos los niveles de proteína y de mRNA de este factor de transcripción después de sobreexpresar miR-433 en HUVEC y comparar su potencial efecto con el de miR-144. Como se muestra en la Figura 28, miR-433 no ejerce ningún efecto ni sobre los niveles de proteína ni sobre los de mRNA. En el caso de miR-144 observamos una tendencia hacia la disminución de la expresión de Nrf2, pero no estadísticamente significativa. Estos datos sugieren por tanto que la inhibición de la expresión inducida por miR-433 sobre GCL es independiente de una disminución de los niveles de Nrf2.

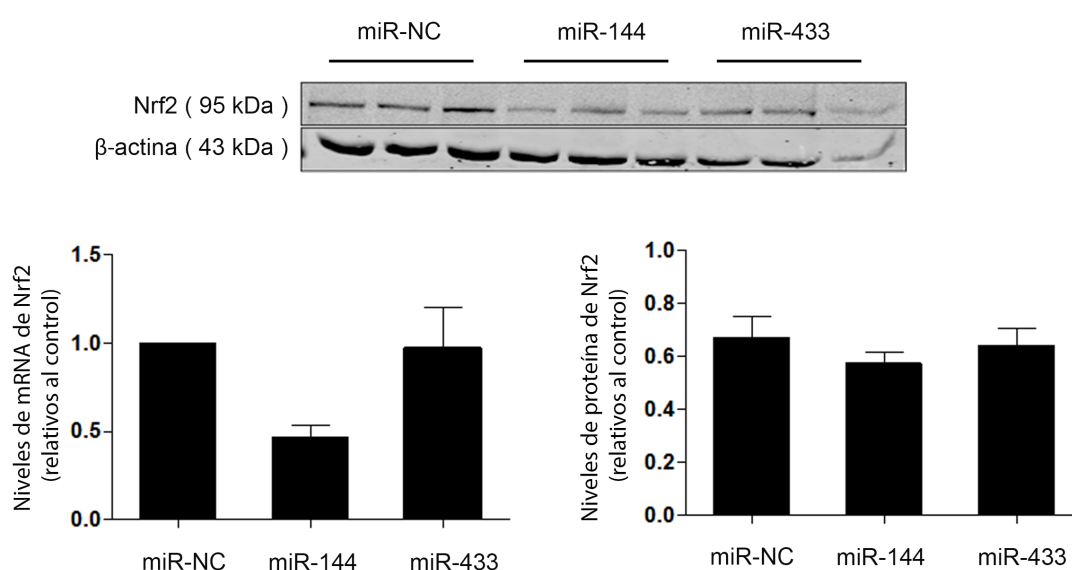


Figura 28: miR-433 no regula los niveles de la proteína Nrf2. El western blot de la parte superior representa los niveles de proteína de Nrf2 (30 μ g) en HUVEC transfectadas con un control negativo (miR-NC), miR-144 o miR-433 (todos 40 nM, 48h). Los gráficos de barras de la parte inferior de la figura representan la media \pm SEM de $n \geq 3$ experimentos tanto para proteína (izquierda) como para mRNA (derecha).

5.1.3 miR-433 inhibe la síntesis de GSH y reduce el tono nucleófilo celular

Para analizar la repercusión funcional de miR-433 sobre el estado redox celular a través del silenciamiento de GCL, se determinaron los niveles de GSH, como producto final de la ruta en células endoteliales, así como el par redox 2GSH/GSSG como determinante principal del tono nucleófilo celular [335] [59]. En la Figura 29 se observa como las células tratadas con miR-433 muestran una reducción del 50% en los niveles de GSH, sin efecto significativo sobre la forma oxidada.

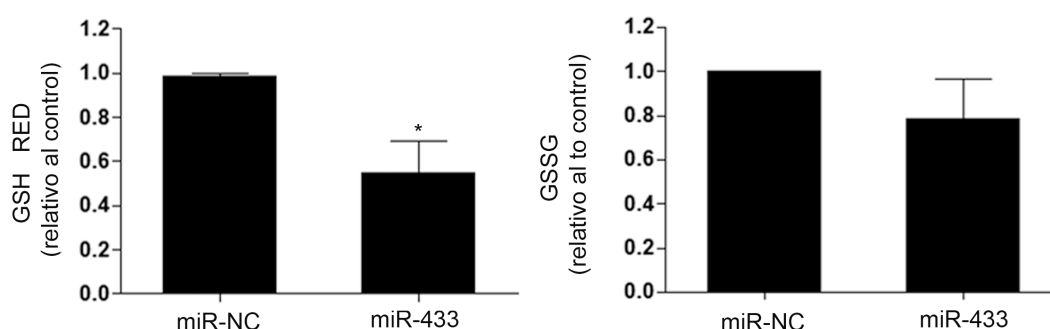


Figura 29: miR-433 inhibe la síntesis de GSH disminuyendo los niveles de su forma reducida. Tras transfectar HUVEC con miR-433 (40nM, 48h) o miRNA control (miR-NC) se determinaron los niveles de GSH (izquierda) y GSSG (derecha) 48 horas después según se indica en el apartado de materiales y métodos. Ambos gráficos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos. * $p < 0,05$ respecto a su control respectivo.

Resultados

En consistencia con estos datos, el cociente 2GSH/GSSG, determinado con la sonda fluorescente roGFP, disminuyó de forma significativa (Figura 30). Además el potencial redox calculado mediante la ecuación de Nernst [328] se vió claramente afectado (Figura 30). El desequilibrio en el ratio 2GSH/GSSG se asocia con un potencial aumento en la S-glutathionilación [5, 336]. Para verificar esta hipótesis, se marcaron HUVEC con glutatión-etil-éster (BIOGEE) en presencia o ausencia de S-nitrosoglutación (GSNO), un inductor de S-glutathionilación [337]. El tratamiento con miR-433 per se dió lugar a un notable aumento en el patrón global de proteínas S-glutathioniladas (Figura 30). Este efecto se vio discretamente potenciado también después de la exposición a GSNO. En conjunto todos estos resultados apoyan la idea de que la sobreexpresión de miR-433 tiene profundas consecuencias sobre la síntesis de GSH, alterando el balance redox hacia la formación de GSSG y disulfuros mixtos.

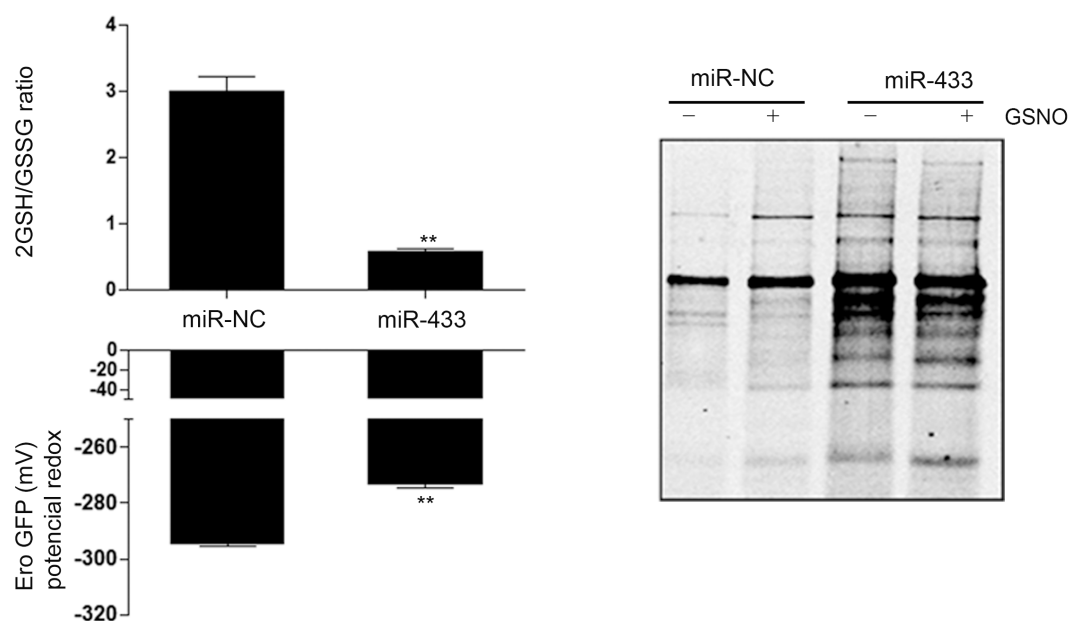


Figura 30: miR-433 modula el balance redox en el endotelio vascular hacia un estado más pro-oxidativo. EL ratio 2GSH/GSSG y el potencial redox (EroGFP) fueron determinados en HUVEC que previamente habían sido transfectadas con miR-433 (40 nM, 48h) o con su control negativo miR-NC como se indica en métodos. Todos los gráficos representan la media \pm SEM de $n\geq 3$. La S-glutathionilación global (panel derecho) se estudió marcando las células con BIOGEE. Las células fueron previamente transfectadas con miR-433 o miR-NC y tratadas con GSNO (50 μ M, 1h) antes del marcaje. Se realizaron “pull-downs” de estas muestras y posteriormente se analizaron con anti-estreptavidina. El blot es representativo de $n=3$, ** $p<0,01$ respecto a su control respectivo.

Teniendo en cuenta estos resultados y que una de las proteínas susceptibles de S-glutathionilación en el endotelio es eNOS, quisimos estudiar si en estas condiciones experimentales se veía modificada. Para ello se utilizaron de nuevo HUVEC transfectadas con miR-433 y se inmunoprecipitó eNOS. En la Figura 31 se puede observar, que de acuerdo con lo mostrado en la Figura 30, la sola presencia de miR-

433 induce la S-glutathionilación de eNOS, observándose un incremento cuando las células se trataron con GSNO. Estos resultados indican que en presencia de miR-433, eNOS podría estar menos activa.

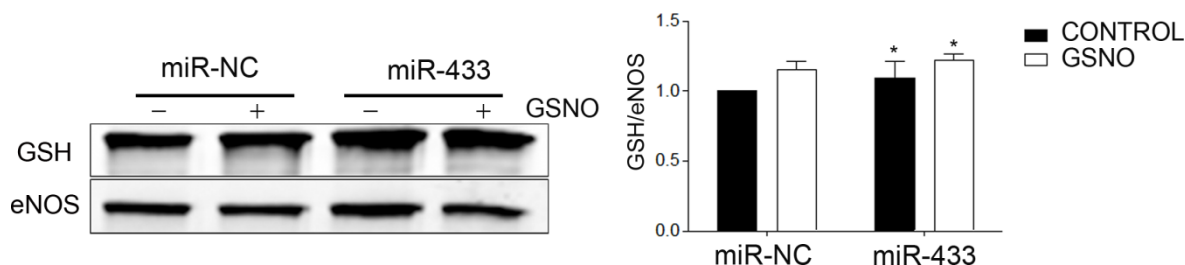
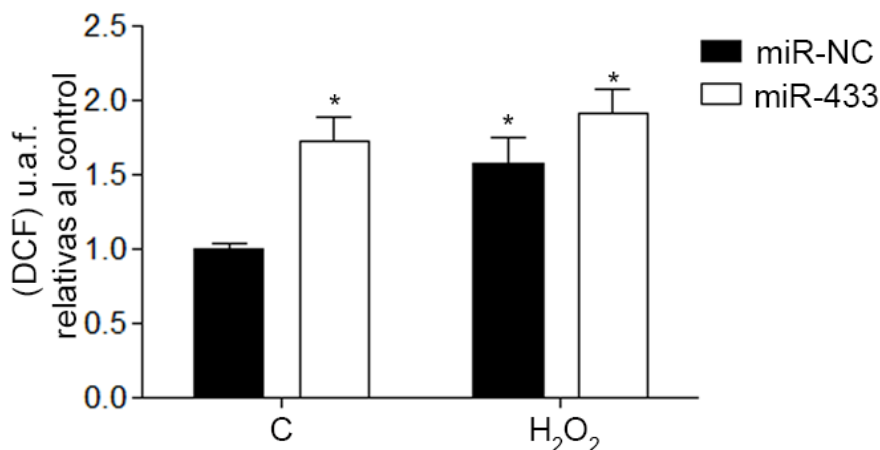


Figura 31: miR-433 favorece la S-glutathionilación de eNOS. La modificación por S-glutathionilación sobre eNOS se estudió mediante inmunoprecipitación de eNOS en HUVEC transfectadas durante 48 h con miR-NC o miR-433 (ambos 40 nM). Las células se trataron con GSNO 50 μ M durante 1 h. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación frente a eNOS como se detalla en métodos y se analizó la glutathionilación de ésta mediante western blot contra GSH y contra la propia eNOS. El gráfico de barras representa la media \pm SEM del análisis densitométrico de $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

Nos preguntamos si miR-433 además de reducir la síntesis de GSH y desequilibrar el cociente 2GSH/GSSG, generaba también un aumento en la producción de ROS y un desequilibrio en el balance redox global. Para ello estudiamos en células HUVEC los niveles de ROS medidos con una sonda inespecífica para ROS como es la 2,7-diclorofluoresceína (DCF). Ésta es altamente fluorescente cuando se oxida, en presencia por ejemplo de peróxido de hidrógeno. Como muestra la Figura 32A, miR-433 aumenta el estrés oxidativo celular, de manera comparable al tratamiento con peróxido. El tratamiento con peróxido de hidrógeno sobre las células HUVEC transfectadas con miR-433 tuvo efectos ligeramente superiores a los de miR-433 en condiciones basales. En estudios complementarios y como medida indirecta del estado redox celular, estudiamos la modificación de los residuos de tirosina de las proteínas por especies reactivas del nitrógeno (RNS). En células endoteliales humanas, en presencia de la sobreexpresión de miR-433 y en condiciones basales no se observó cambio alguno. Sin embargo cuando tras la transfección se trataron las células con SIN-1, un generador de peroxinitrito, se observó un mayor marcaje en las células tratadas con miR-433 (Figura 34B). Por tanto un aumento de miR-433 en la célula desencadena un aumento de ROS, que favorece la nitro-tirosinación frente a un estímulo específico generador de RNS.

A



B

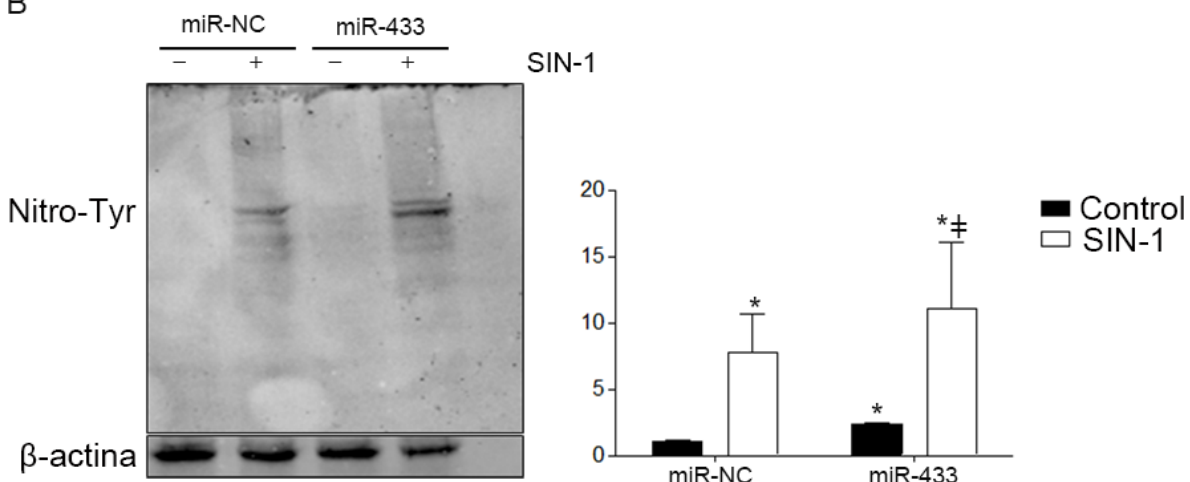


Figura 32: miR-433 rompe el equilibrio redox celular. A) Las HUVEC se transfectaron con miR-NC o miR-433 (ambos 40 nM, 48h). Después se trataron con H₂O₂ 500 μM durante 5 min, se añadió la sonda DCF 2,5 μM y se incubaron durante 30 min. Posteriormente las células se despegaron por tripsinización y se analizaron por citometría de flujo. El gráfico de barras representa las medias ± SEM de los niveles de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.f) de al menos 3 experimentos. B) Las HUVEC se transfectaron con miR-NC o miR-433 40 nM durante 48 horas y después se trataron con SIN-1 500 μM durante 1 hora. Los lisados de proteína (30 μg) se analizaron mediante western blot frente a nitrotirosina. El gráfico de barras representa el análisis densitométrico de la media ± SEM de 3 experimentos independientes, *p<0,05 respecto al control negativo sin tratar. #p<0,05 respecto a miR-433 sin tratar.

El GSH es esencial para la supervivencia celular y su depleción ha sido asociada a muerte celular por apoptosis y activación de caspasa-3, que a su vez puede cortar la subunidad catalítica de GCL, reduciendo más la síntesis de GSH. Para estudiar si miR-433, al agotar GSH y aumentar los niveles de ROS, también estaba desencadenando un aumento en la muerte celular, se analizó la activación de caspasa-3 mediante inmunohistoquímica. En células transfectadas con miR-433 el número de células marcadas con caspasa-3 activa era significativamente superior a

las que estaban transfectadas con el microRNA control. Los tratamientos con peróxido de hidrógeno también fueron capaces de inducir apoptosis, sin embargo en las células transfectadas con miR-433 y peróxido de hidrógeno sólo se observó una tendencia al aumento en la apoptosis (Figura 33).

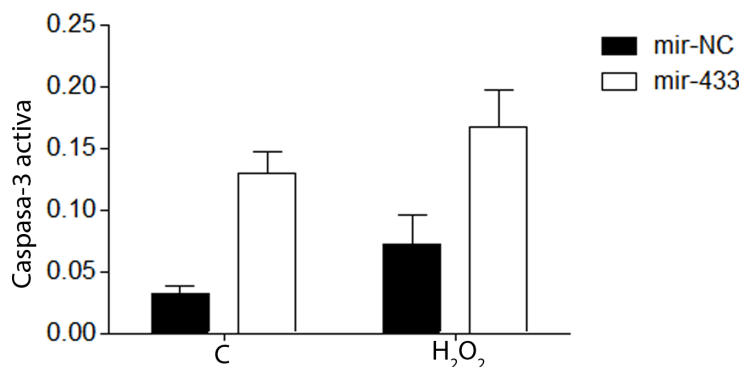


Figura 33: miR-433 aumenta la activación de caspasa-3. Las HUVEC fueron transfectadas durante 48 horas con miR-NC o miR-433 (40 nM) sobre cubres. Se trataron con peróxido de hidrógeno 500 μ M durante 5 min, y tras fijación se realizó una inmunohistoquímica frente a caspasa-3 activa. El gráfico de barras representa la media \pm SEM del número de células.

También se evaluó si los efectos funcionales asociados con miR-433 y relacionados con la depleción de GSH podrían causar disfunción endotelial. Para ello se transfectaron HUVEC con miR-433 y se observó una disminución significativa en la forma activa (fosforilada) de eNOS (S1177) en respuesta a tratamientos cortos con peróxido de hidrógeno (Figura 34), lo que sugiere que miR-433 tiene un efecto deletéreo en la función vascular causado por la depleción de GSH [69, 338].

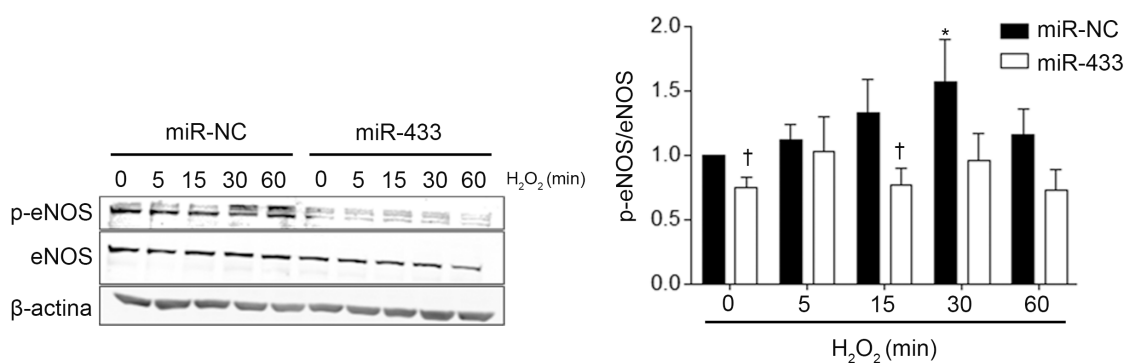


Figura 34: Efecto de miR-433 sobre la activación de eNOS. Las HUVEC se transfectaron con miR-433 y su respectivo control miR-NC (40 nM, 48h) y se mantuvieron sin FBS al menos 6h antes de ser tratadas con H₂O₂ (200 μ M) durante los tiempos indicados y fueron analizadas mediante western blot de p-eNOS (S1177) y eNOS total. El gráfico de barras (panel derecho) corresponde a la cuantificación del cociente p-eNOS/eNOS de una n=4. *p<0,05 respecto a su control sin tratar y †p<0,05 respecto al correspondiente tiempo control.

5.2 Regulación inversa de GCL y miR-433 mediada por estímulos pro-oxidantes

5.2.1 Efecto de la depleción de GSH en células endoteliales

Para evaluar el efecto que ejerce el estrés oxidativo sobre la expresión de GCL y la regulación de la expresión de miR-433, se procedió a reducir los niveles de GSH en HUVEC, usando el inhibidor químico de la biosíntesis del glutatión, L-butionin-sulfoxamina (L-BSO). El tratamiento con L-BSO redujo de forma significativa los niveles de GSH en un 80% (Figura 35).

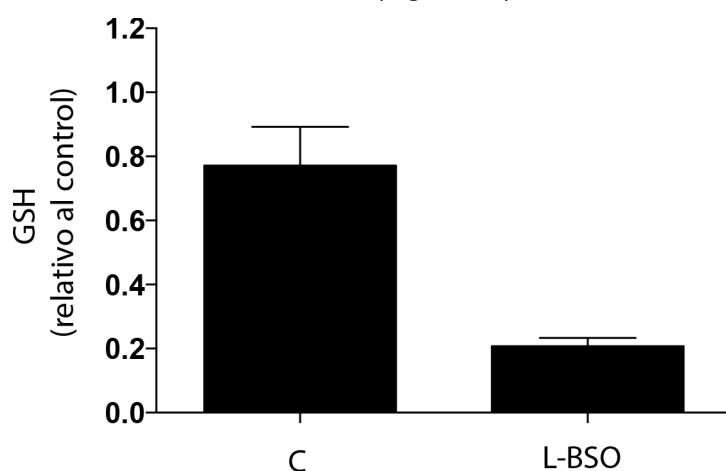


Figura 35: Efecto de L-BSO en células endoteliales. El gráfico representa los niveles de GSH en HUVEC al 70% de confluencia tratadas con L-BSO 500 μ M durante 16 h (media \pm SEM, $n \geq 3$).

Además el tratamiento con L-BSO fue capaz de promover un aumento los niveles de proteína de GCLc y GCLm (Figura 36A). Los niveles de mRNA de ambas subunidades experimentaron un cambio similar al de proteína (Figura 36B). Este resultado podría explicarse por un efecto “feedback” regulador entre la expresión de GCL y el producto final de la reacción, el GSH [6, 28].

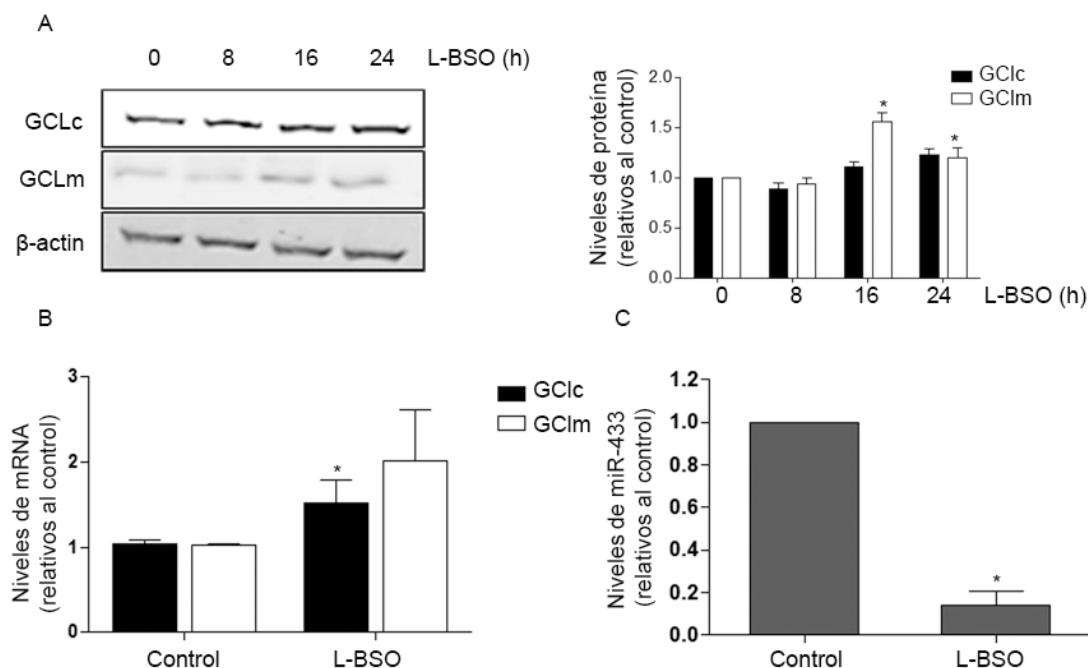


Figura 36: La depleción de GSH aumenta los niveles de GCL mientras que reprime los de miR-433. Las HUVEC fueron tratadas con 500 μ M L-BSO durante los tiempos indicados o durante 8 h cuando no se indica. A) Se muestra un western blot representativo de una $n \geq 3$ de las proteínas GCLc y GCLm. El histograma (derecha) representa el correspondiente análisis densitométrico (media \pm SEM). B) El gráfico representa los niveles de mRNA de ambas subunidades de GCL de al menos tres experimentos independientes (media \pm SEM). C) EL histograma representa la media \pm SEM de los niveles de miR-433 cuantificados por qPCR después de la exposición de las HUVEC a L-BSO, * $p < 0,05$ respecto a su control.

5.2.2 Efecto de peróxido de hidrógeno sobre la expresión de miR-433 en HUVEC

El uso de tratamientos pro-oxidantes en endotelio, como peróxido de hidrógeno, fue capaz de modular la expresión de ambas subunidades de GCL, debido a la activación de la vía Nrf2. Como se muestra en la Figura 37, el tratamiento con H_2O_2 en HUVEC durante 8 horas, indujo la expresión de mRNA de la subunidad moduladora, mientras que redujo la de miR-433 (Figura 37A). De acuerdo con estas observaciones, el peróxido de hidrógeno mostraba una tendencia a disminuir la expresión de miR-433 de manera dependiente del tiempo de exposición al tratamiento (Figura 37B). Esto podría apoyar una regulación inversa entre GCL y miR-433 en presencia de estímulos oxidativos.

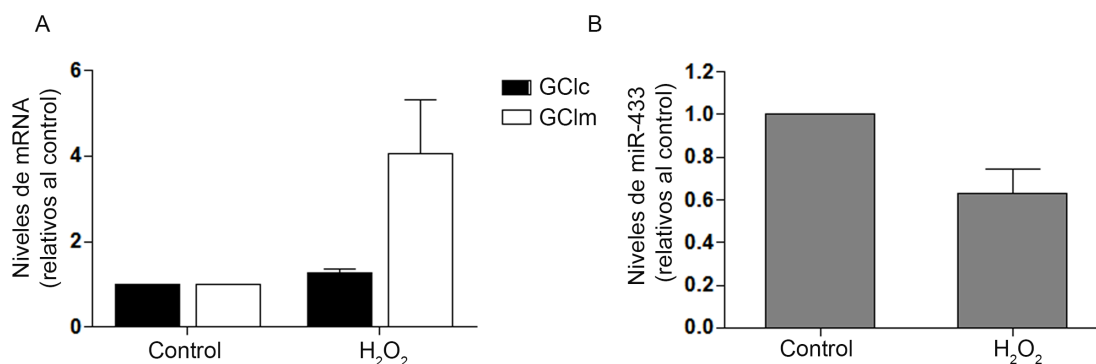


Figura 37: Regulación inversa de GCL y miR-433 mediada por estrés oxidativo. Las HUVEC fueron tratadas con 200 μM H₂O₂ durante 8 horas. A) El histograma representa los niveles de mRNA de GCLc y GCLm de al menos tres experimentos independientes (media ± SEM). B) EL gráfico de barras representa la media ± SEM de los niveles de miR-433 cuantificados por qPCR después de la exposición de las HUVEC a H₂O₂.

5.2.3 El estrés oxidativo asociado al daño hepático modula la expresión de GCL y miR-433.

El daño hepático también ha sido relacionado con la depleción de glutatión [54, 339]. Para explorar la función de miR-433 en este contexto, se expusieron células HepG2 a estrés oxidativo, promovido por peróxido de hidrógeno en tiempos crecientes. La expresión de mRNA de GCLc y GCLm aumentó significativamente con un máximo a las 8 horas de tratamiento con peróxido de hidrógeno y una disminución progresiva a partir de este punto (Figura 38A). Al igual que ocurría en el modelo hepático el peróxido de hidrógeno disminuyó la expresión de miR-433 de una forma dependiente del tiempo y de exposición al tratamiento (Figura 38B).

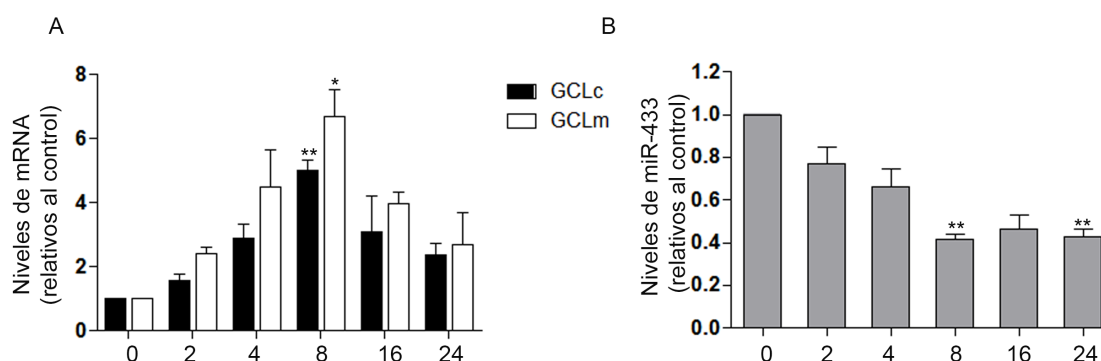


Figura 38: La exposición de células hepáticas a H₂O₂ aumenta los niveles de GCL y disminuye los de miR-433. Las células HepG2 fueron tratadas con 200 μM H₂O₂ durante los tiempos indicados. Los gráficos de barras representan los niveles de mRNA de A) GCLc y GCLm y de B) miR-433 de la exposición de HepG2 a 200 μM H₂O₂ analizados por PCR cuantitativa (media ± SEM n=3). *p<0,05, **p<0,01 respecto al control.

Resultados

El modelo de daño colestático cursa *in vivo* con una reducción de los niveles hepáticos de GSH a tiempos largos. El tratamiento con ácido litocólico en células Huh7 recapitula los efectos del daño colestático *in vitro*, con un efecto dual en el que a tiempos cortos se observa un aumento de defensas antioxidantes y una posterior disminución a más largo plazo [29]. Como se muestra en la Figura 39, los tratamientos con este compuesto parecen tener una tendencia a aumentar la expresión de proteína y mRNA de GCLc (Figura 39A y C), junto con un posible aumento de la expresión del mRNA de GCLm y Nrf2. Este tendencia se acompaña de un incremento en los niveles de ROS, aunque no significativa (Figura 39B).

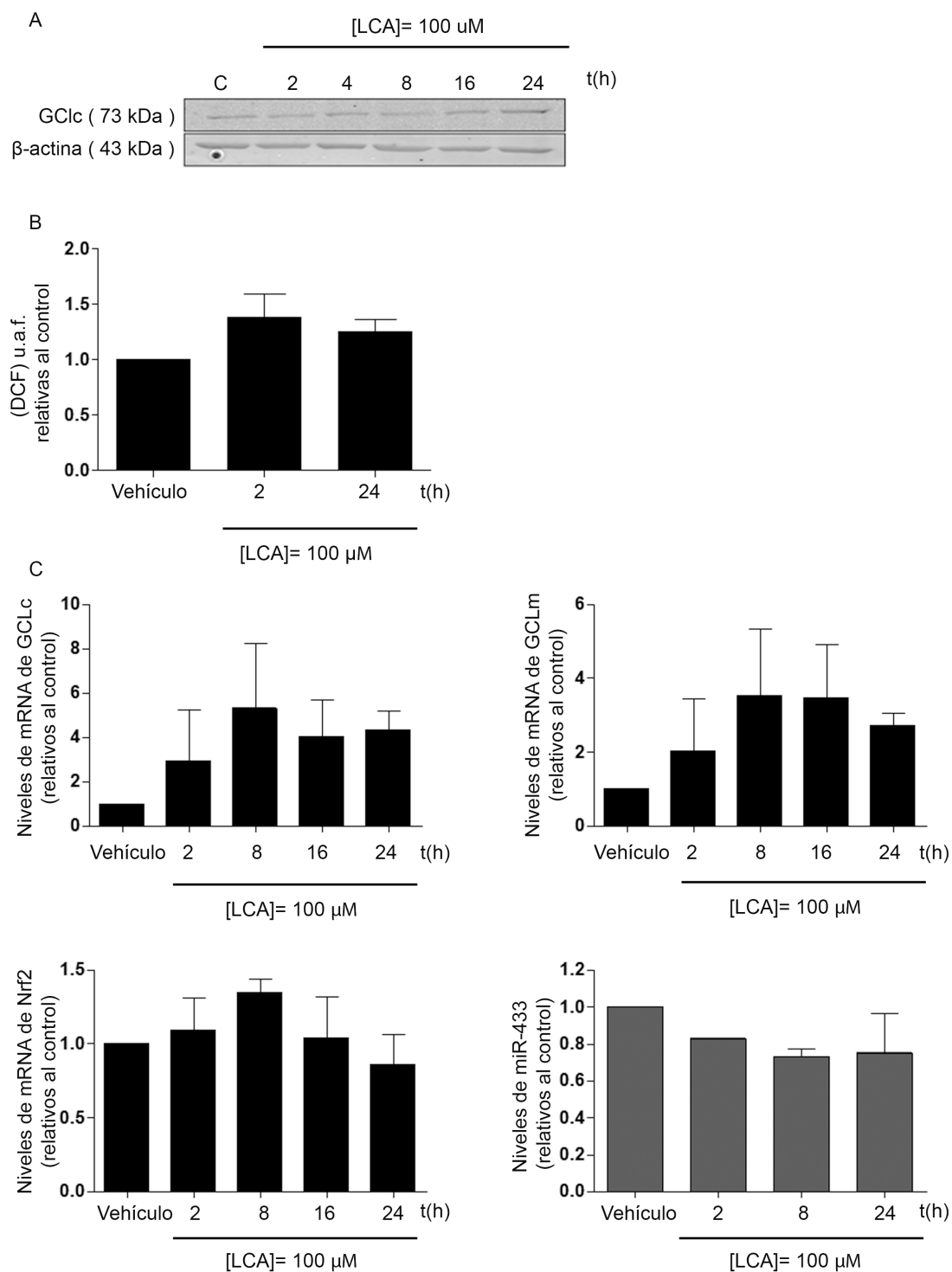


Figura 39: La exposición de células hepáticas a LCA genera un aumento de estrés oxidativo que modula los niveles de GCL y miR-433. Se trataron células Huh7 con 100 μ M LCA durante los tiempos indicados. A) Western blot representativo en el que se muestran los niveles de GCLc. B) El gráfico de barras representa el valor de ROS medido con DCF (media \pm SEM, n=3) C) Los gráficos de barras representa los niveles de mRNA de GCLc, GCLm, Nrf2 y de miR-433 tras la exposición de Huh7 a 100 μ M de LCA analizados por PCR cuantitativa (media \pm SEM n=3).

5.2.4 Nrf2 como elemento esencial en la expresión de GCL y en la propia expresión de miR-433.

Aunque la regulación de GCL por miR-433 es independiente de Nrf2, es importante resaltar que Nrf2 es un elemento clave en el control de la expresión de GCL [84] y por tanto, como cabía, esperar su silenciamiento se asoció con una clara disminución de los niveles basales de GCL, que fue más evidente en el caso de GCLm (Figura 40A), reduciendo también los niveles del producto final, GSH (Figura 40B). Además Nrf2 parece tener una función reguladora sobre la expresión de miR-433, ya que en ausencia de este factor de transcripción la expresión de miR-433 se redujo (Figura 40B). Estos resultados son consistentes con los observados con L-BSO que también fue capaz de abolir la expresión de miR-433 (Figura 36).

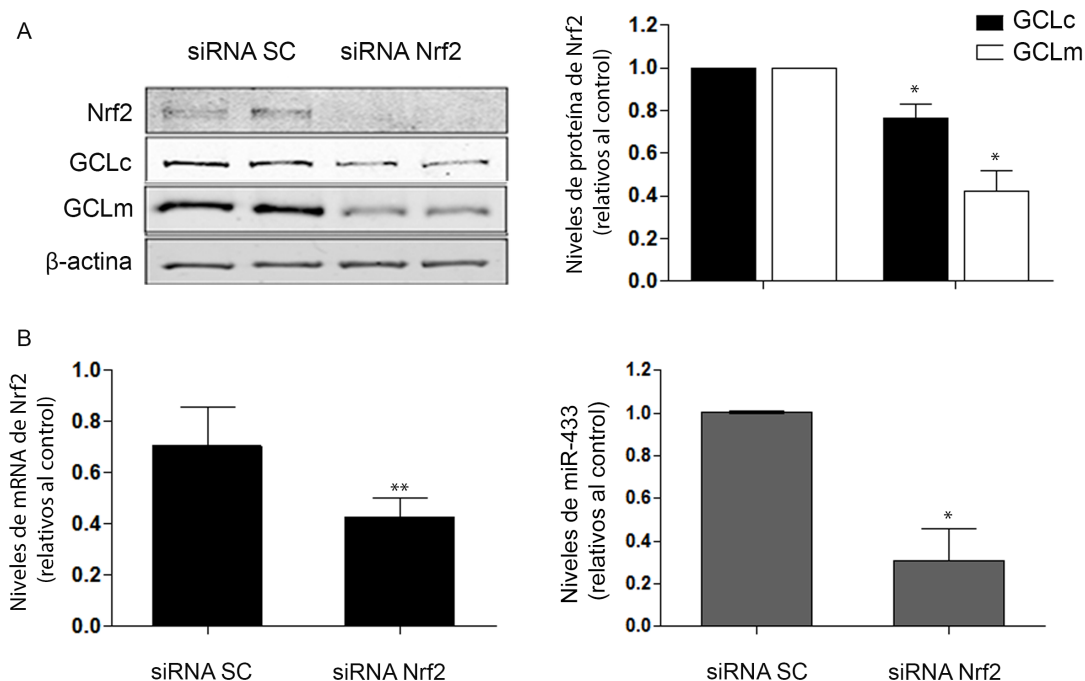


Figura 40: Nrf2 es necesario para la expresión de GCL y de miR-433. A) Efecto del silenciamiento de Nrf2 sobre la expresión de GCL (proteína y RNA) en HUVEC. Western blot representativo de Nrf2, GCLc y GCLm después del tratamiento con siRNA control (SC) o siRNA para Nrf2 (40nM, 48h). B) EL gráfico de barras representa los niveles de mRNA de GCL (arriba derecho) y los de miR-433 (panel inferior) tras el silenciamiento de Nrf2, media \pm SEM de al menos 3 experimentos, *p<0,05; **p< 0,01 respecto al siRNA control.

5.3 Regulación de miR-433 frente a distintos estímulos en diferentes modelos endoteliales

5.3.1 Efecto de miR-433 sobre la transducción de señales intracelulares

Una vez caracterizado el efecto de miR-433 sobre GCL y los efectos que ejerce sobre la supervivencia celular se analizó el posible impacto sobre otras vías de señalización implicadas en el estado redox. Para ello se utilizó el mismo modelo endotelial humano, sometiendo estas células a distintos tratamientos en presencia o ausencia de miR-433.

Teniendo en cuenta la importancia del factor de crecimiento vascular VEGF en el endotelio, y también en la activación de eNOS dependiente de Akt, se quiso analizar el efecto de miR-433 sobre vías activadas por el factor de crecimiento vascular (VEGF). Este factor de crecimiento activa vías de angiogénesis y vasculogénesis. Se une a sus distintos receptores induciendo la activación de vías de proliferación y supervivencia como la vía de PI3K-Akt [340, 341]. En HUVEC transfectadas con miR-433 se analizó mediante western blot la activación de las distintas proteínas de la vía (Figura 41). Se observó que la fosforilación activadora de Akt tenía una tendencia a disminuir, sin embargo los niveles totales de la enzima permanecieron intactos. Se descartó que este efecto se debiese a una menor expresión de p85, la subunidad catalítica de PI3K (Figura 41D). Sin embargo el efecto de la inhibición sobre dianas como GSK3 y FOXO también parecía ser menor, siendo los niveles de fosforilación menores que en los de miR-NC, sin cambio significativo en los niveles totales de proteína. Sin embargo en este caso la fosforilación de eNOS no parecía verse afectada.

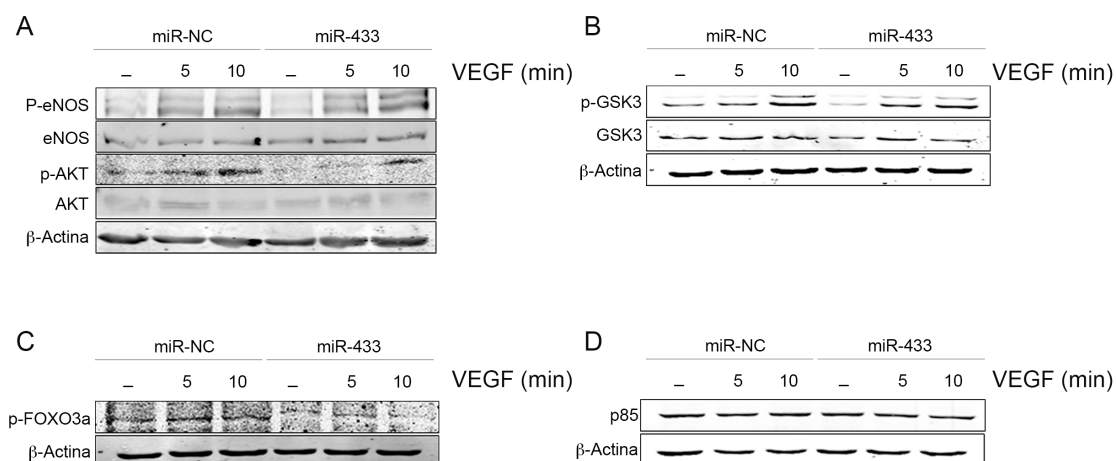


Figura 41: Efecto de miR-433 en la activación de la vía de Akt. Las HUVEC fueron transfectadas con miR-433 y su respectivo control miR-NC (40 nM, 48h) y se mantuvieron sin FBS al menos 6h antes de ser tratadas con VEGF (5ng/μl) durante los tiempos indicados y analizadas mediante western blot para A) p-eNOS (S1177) y eNOS total y p-Akt y Akt. B) frente a p-GSK3 y GSK3 total. C) contra p-FOXO3a y D) frente a la subunidad de PI3K, p85.

Para analizar si la inhibición del microRNA endógeno revertía el efecto o aumentaba aún más la fosforilación dependiente de VEGF se utilizó un inhibidor o antagomiR específico para miR-433. Como se muestra en la Figura 42, el antimiR-433 no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de Akt, ni de GSK3 al igual que se había observado que no ejercía ningún efecto ni sobre los niveles de proteína de GCL, ni sobre la síntesis de GSH (Figura 25).

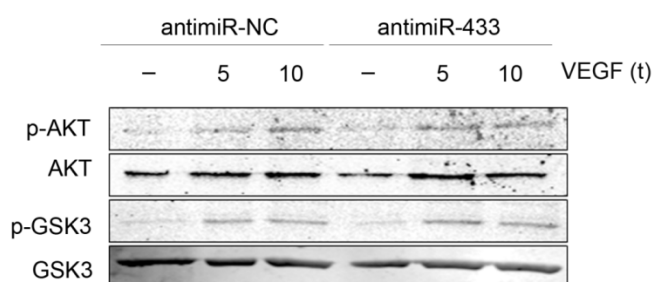


Figura 42: Influencia de la inhibición de la expresión de miR-433 sobre la vía PI3K-Akt. Las células HUVEC se transfectaron con 80 nM de antagomiR control (antimiR-NC) o el correspondiente inhibidor de miR-433 (antimiR-433) durante 48 horas. Se analizó la expresión de las distintas proteínas (30 μg) mediante western blot frente a p-Akt, Akt total, p-GSK3 y GSK3 total. La figura muestra una westernblot representativo.

Para analizar cómo la depleción de GSH en la célula podría afectar a estas dos vías redox dependientes, pero separando los efectos del microRNA, se realizaron experimentos similares a los anteriores, tratando células HUVEC con el inhibidor para la subunidad catalítica de GCL, L-BSO a 50 nM durante toda la noche y luego

tratando las células con VEGF o bien silenciando GCLc con un siRNA específico, mediante su transfección en las células durante 48 horas. En ambos casos no se observó ningún efecto sobre la fosforilación de AKT (Figura 43A y B) o sobre la fosforilación de GSK3 (Figura 43B), sin embargo en ambos casos al igual que se había observado con miR-433 frente a tratamientos con peróxido de hidrógeno (Figura 34) la fosforilación de eNOS parecía ser inferior que en el control, lo que indica que la menor fosforilación de eNOS y por tanto, su menor activación podrían depender no tanto de miR-433, como de los niveles de GSH y el estado redox en la célula.

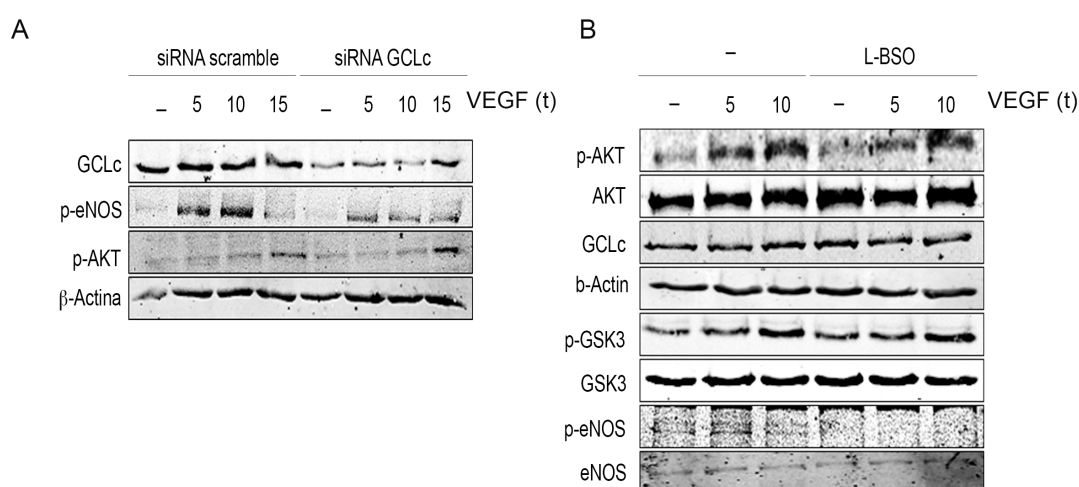


Figura 43: Silenciamiento e inhibición de GCL sobre activación dependiente de VEGF. A) Las células fueron transfectadas con 30 nM de siRNA control (scramble) o un siRNA específico para GCLc (siRNA GCL) durante 48 horas. Se mantuvieron en medio sin suero un mínimo de 6h y después se trataron con 5 ng/ μ l de VEGF en los tiempos indicados. Los niveles de expresión proteica se analizaron mediante western blot frente a GCLc, p-ENOS, p-AKT y actina. B) Las HUVEC al 70% de confluencia se incubaron en medio sin suero durante 6 horas, y se trataron durante 16 h con L-BSO 50 nM, después se trataron con VEGF (5 ng/ μ l) durante el tiempo indicado. La proteína (30 μ g) se analizó mediante western blot frente a p-Akt, Akt total, GCLc, p-GSK3, GSK3 total, eNOS y p-eNOS

5.3.2 Efecto de 17- β -estradiol sobre la expresión de GCL en células endoteliales

Se ha descrito que el promotor de miR-433 contiene sitios de unión para el receptor nuclear de estrógenos ERR γ (Ver apartado 2.10 miR-433). Para estudiar si los tratamientos con estas hormonas podrían generar cambios de expresión en GCL, debidos al incremento de la expresión de miR-433 se utilizaron células endoteliales de aorta bovina (BAEC) y se trataron durante 24 horas con distintas concentraciones de 17- β -estradiol (E2) o GSK4716, un agonista de estrógenos que tiene una mayor afinidad por el receptor. La expresión de GCLc en presencia de estradiol se vio

Resultados

disminuida a partir de 200 nM de E2 (Figura 44), mientras que la aparente reducción generada por GSK4716 no fue significativa (Figura 44).

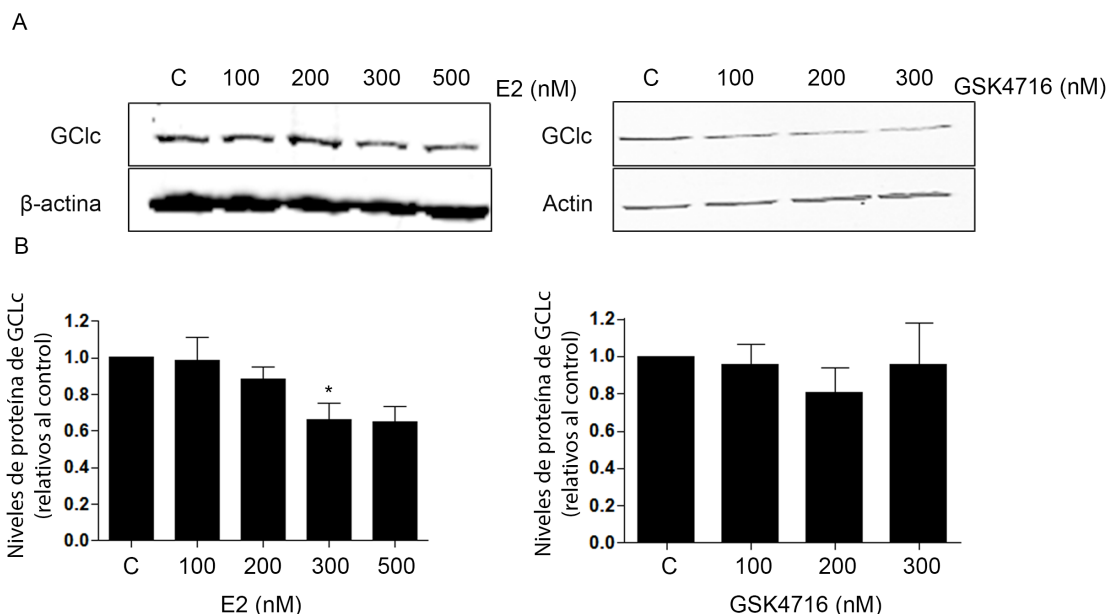


Figura 44: Efecto de los estrógenos sobre la expresión de GCL. Las BAEC se cultivaron hasta alcanzar un 70% de confluencia. Tras seis horas en medio sin suero, se trataron con las concentraciones indicadas de E2 o GSK4716 durante 24 horas. A) La expresión de proteína se analizó mediante western blot frente a GCLc. El histograma representa el análisis densitométrico (media \pm SEM) de más de 3 experimentos. B) Células BAEC al 70% de confluencia y en medio basal se trataron con diferentes concentraciones de GSK4716 (indicadas) durante 24 h. Western blot representativo frente a GCLc. La gráfica representa la determinación densitométrica de los niveles de proteína de GCLc (media \pm SEM, $n \geq 3$), * $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta la reducción de la proteína GCLc observada con E2, también se evaluó la expresión de mRNA de ambas subunidades de GCL y del factor de transcripción Nrf2, en presencia de esta hormona. La expresión del mRNA de GCLc al igual que pasaba con la de proteína disminuye significativamente a partir de una concentración 200 nM de E2 (Figura 45A). Sin embargo tanto GCLm como Nrf2 no presentan una reducción significativa (Figura 45B y C).

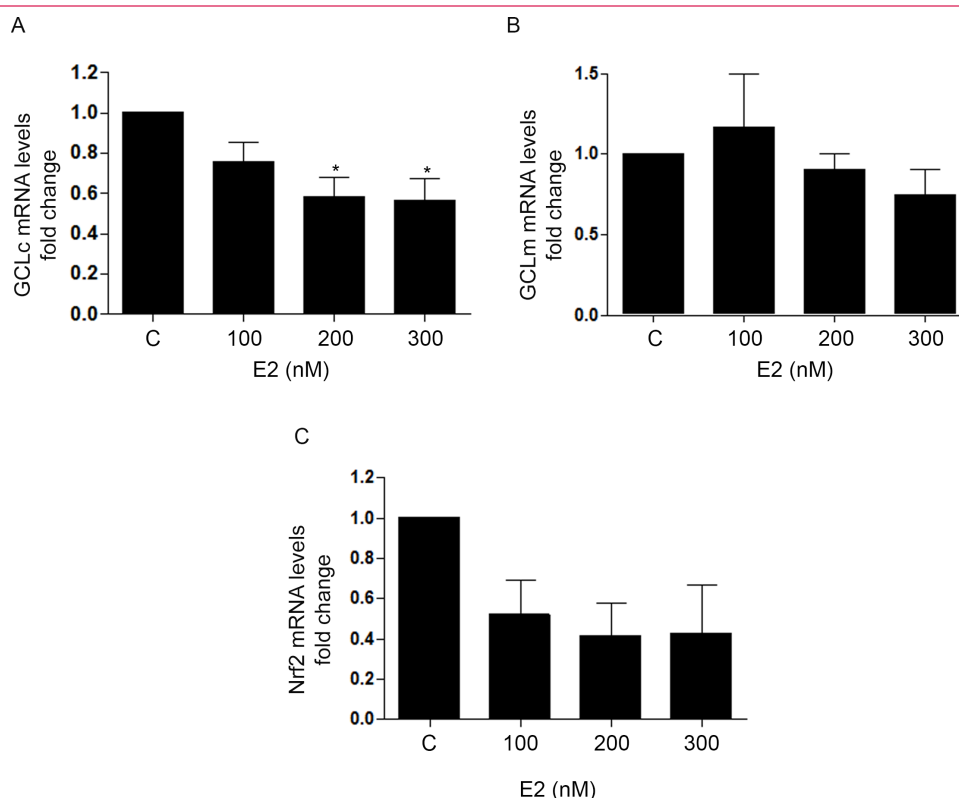


Figura 45 Efecto de 17- β -estradiol sobre la expresión génica de GCLc. Las BAEC fueron cultivadas hasta el 70% de confluencia, y tras 6 horas sin suero se trataron durante 24 horas con las concentraciones indicadas de E2. A) El gráfico representa media \pm SEM del análisis mediante PCR cuantitativa de GCLc. B) El gráfico de barras representa la expresión de GCLm por PCR cuantitativa (media \pm SEM, $n \geq 3$) C) El gráfico representa los valores de la media \pm SEM de Nrf2 medido por PCR cuantitativa de al menos 3 experimentos independientes * $p < 0,05$

Sin embargo el efecto de la disminución de GCLc producido por los tratamientos con E2, sí se vio reflejado en la posible inhibición de la síntesis de GSH, observándose una tendencia a la disminución de los niveles de GSH reducido, que fue dependiente de la concentración de hormona (Figura 46).

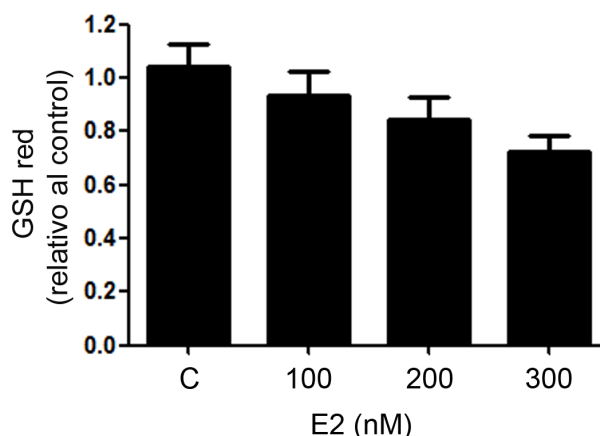


Figura 46: El tratamiento con 17- β -estradiol reduce los niveles de GSH. Las BAEC se cultivaron hasta el 60 % de confluencia y tras 6 horas sin suero se trataron con las concentraciones indicadas de E2. El gráfico representa los niveles de GSH reducido calculados como media \pm SEM de al menos 3 experimentos.

Resultados

Se obtuvieron efectos similares a los observados en células bovinas en el modelo endotelial humano. En HUVEC tratadas con estradiol se observó una disminución, aunque no significativa de los niveles de mRNA de GCLc, GCLm y Nrf2 (Figura 47). Sin embargo, contrario a lo esperado, también se observó una reducción de los niveles de miR-433.

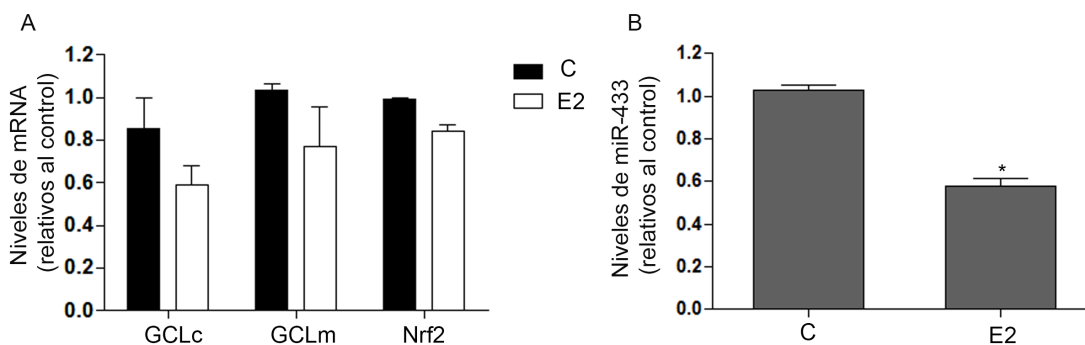


Figura 47: Efecto de estradiol sobre la expresión de GCLs, Nrf2 y miR-433 en células endoteliales humanas. Las HUVEC se cultivaron hasta 70% de confluencia, y tras 6 horas sin suero se trataron con 300 nM de E2. A) El gráfico de barras representa los valores de mRNA (media \pm SEM) de GCLc, GCLm y Nrf2 determinados por PCR cuantitativa. B) Expresión de miR-433 determinada por PCR (media \pm SEM, $n \geq 3$). * $p < 0,05$.

5.3.3 Ensayo de actividad luciferasa con el 3'-UTR bovino de GCLc y agonistas de receptores de estrógenos

Para evaluar de una forma indirecta si en el modelo celular bovino existía regulación de la expresión de miR-433 por estrógenos se utilizó un plásmido reportero de luciferasa con la secuencia correspondiente al 3'-UTR de GCLc bovino. Las células transfectadas con esta construcción fueron posteriormente tratadas con diferentes dosis de E2 o GSK4716. Los tratamientos con ambos compuestos redujeron significativamente la actividad luciferasa en aproximadamente un 20% (Figura 48A). Para estudiar si el efecto observado se debía a miR-433, se utilizó el inhibidor de miR-433, que fue capaz de revertir la disminución de actividad luciferasa producida por E2 y por GSK4716 (Figura 48B).

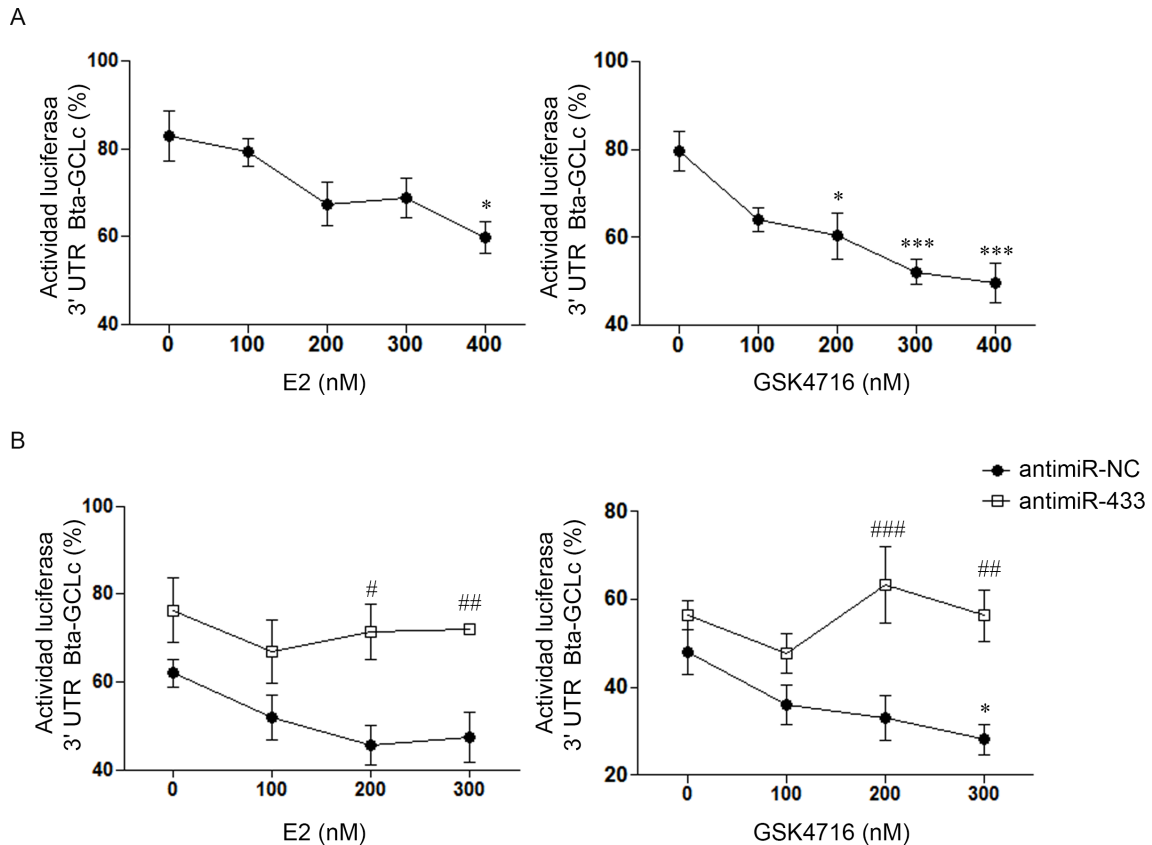


Figura 48: Efecto de estrógenos sobre la región 3'-UTR de GCLc. A) Las BAEC se transfectaron con la construcción de *Bta*-psiCHECK2-3'-UTR-GCLc (125 ng) durante 12 horas, después se trataron durante 12 horas más con las concentraciones indicadas de E2 (zq) o GSK4716 (derecha). Los gráficos de barras representan la actividad luciferasa relativa del 3'-UTR-GCLc respecto al control sin tratar (media \pm SEM, $n \geq 3$). B) Las BAEC se transfectaron con la construcción de *Bta*-psiCHECK2-3'-UTR-GCLc (125 ng), el inhibidor control (anti-miR-NC) y anti-miR-433 (ambos 80 nM) durante 12 horas, después se trataron durante 12 horas más con las concentraciones indicadas de E2 (zq) o GSK4716 (derecha). Las curvas representan la actividad luciferasa relativa del 3'-UTR-GCLc respecto al inhibidor control sin tratar (media \pm SEM, $n \geq 3$). *Bta*=*Bos taurus*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ respecto al control. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la concentración correspondiente del inhibidor control.

De acuerdo con estos resultados y los obtenidos en células humanas, sugieren que la regulación en el modelo in vitro de miR-433 sobre GCL producida por estradiol, es más compleja de lo esperado y requiere de otras aproximaciones para poder comprenderla mejor.

5.4 miR-433 regula la respuesta redox asociada a daño fibrótico

Como se ha descrito ampliamente en la introducción el desarrollo fibrótico se encuentra relacionado con un aumento del estrés oxidativo, existiendo también una relación directa con la disminución de GCL y de los niveles de GSH, tanto en un modelo de fibrosis hepática, como en un modelo de fibrosis renal (Ver apartado 2.5.2 Fibrosis). Igualmente en un modelo murino de fibrosis renal se ha descrito un aumento de los niveles de miR-433 en respuesta a TGF- β [305]. Por lo cual quisimos analizar la posible interacción de miR-433 y GCL en un contexto fibrótico.

5.4.1 Fibrosis hepática

Para investigar el papel de miR-433 en este contexto fisiopatológico estudiamos su función en dos modelos diferentes de daño tisular. El primero de estos modelos es la inducción de un daño hepático mediante ligadura del conducto biliar, un procedimiento que genera colestasis, disfunción hepática y fibrosis asociada a depleción de GSH [29, 339]. La disminución de los niveles de GCLc y GCLm es visible a partir de las 24 horas post-cirugía y se acompaña también de reducción en los niveles de mRNA de ambas subunidades a partir de los 7 días post-cirugía (Figura 49A y B). Los niveles de miR-433 aumentaron también significativamente a los 14 y 21 días después de la ligadura del conducto biliar (Figura 49C) lo que sugiere relación entre la disminución de GCL y la expresión del miRNA.

Para evaluar la respuesta celular que puede sustentar los efectos antes descritos, utilizamos la línea de hepatoma humano Huh7 y la expusimos a TGF- β 1, la citoquina profibrótica por excelencia. EL tratamiento de las células Huh7 con TGF- β 1 indujo una reducción en los niveles de proteína de ambas subunidades de GCL, acompañada de una disminución significativa de los niveles de GSH reducido (Figura 50A y B). De acuerdo con esta disminución a las 48 horas de exposición de las células de hepatoma Huh-7 a TGF- β 1, miR-433 aumentó significativamente respecto a las células no tratadas.

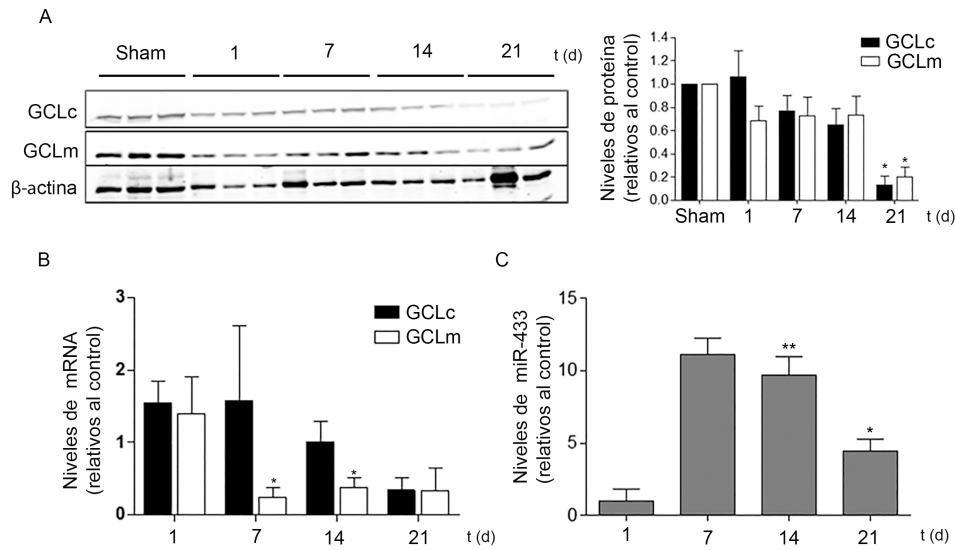


Figura 49: La ligadura del conducto biliar reduce la expresión de GCL y aumenta la expresión de miR-433. A) El western blot muestra los niveles de proteína de GCLc y GCLm de hígado total tras 1, 7, 14 y 21 días post-operación. El gráfico representa el análisis densitométrico de al menos 3 ratones (media \pm SEM, * p <0,05 respecto a su ratón operado control. B) Expresión de mRNA de GCLc y GCLm en hígado analizado por qPCR. C) Expresión de miR-433 en los hígados operados analizados por qPCR. Los gráficos de barras representan los niveles de RNA, media \pm SEM $n \geq 3$ * p <0,05; ** p <0,01 respecto al tiempo de 1 día.

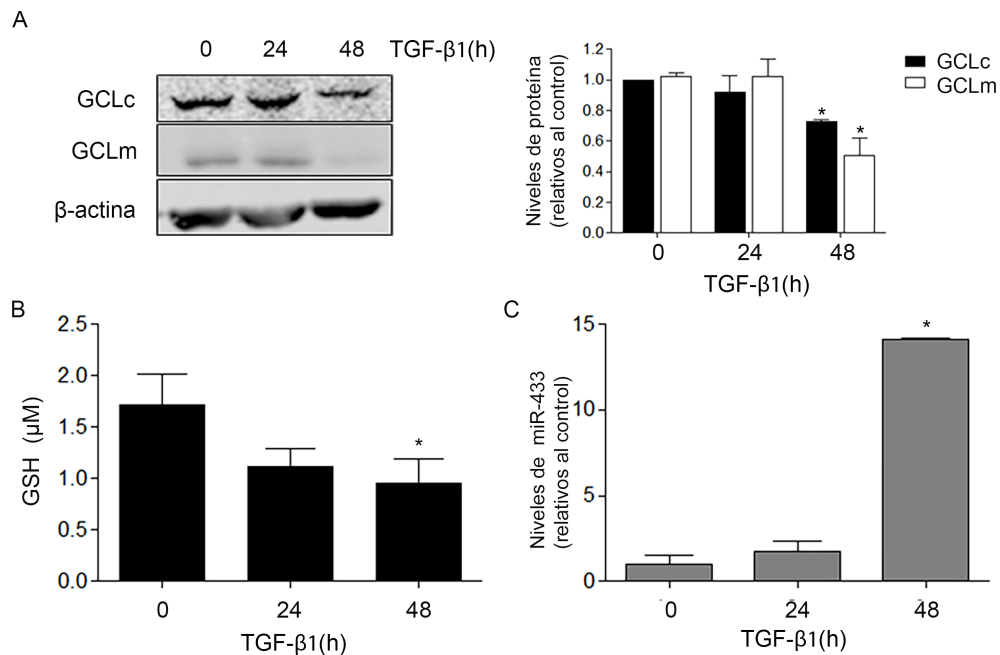


Figura 50: Efecto de la citoquina profibrótica TGF β 1 sobre la expresión de GCL. Las células Huh-7 se cultivaron hasta un 70% de confluencia, se privaron de FBS y se trataron con TGF- β 1 (5 ng/ μ L) durante los tiempos indicados. A) Western blot representativo de la disminución de GCLc y GCLm por efecto de TGF- β 1 (5 ng/ μ L). El gráfico de barras representa los valores medios del análisis densitométrico, media \pm SEM ($n=4$). B) El histograma representa los valores de GSH reducido (media \pm SEM, $n=4$) en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1 (5 ng/ μ L) durante 24 y 48 horas. C) Niveles de expresión de miR-433 en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1 durante los tiempos indicados. El gráfico de barras representa el análisis realizado mediante PCR cuantitativa, media \pm SEM $n \geq 3$. * p <0,05; ** p <0,01 respecto al tiempo de 1 día.

Para caracterizar la participación de miR-433 en la regulación de GCL en las células Huh-7 se realizaron experimentos en presencia del inhibidor del microRNA, antimiR-433. Cuando las células fueron tratadas con antimiR-433 la inhibición producida sobre ambas subunidades de GCL se ve abolida (Figura 51A). Además, el factor TGF- β 1 indujo la expresión del marcador profibrótico α -actina (α SMA), y de acuerdo con lo observado en GCL, esta inducción disminuyó cuando se transfectaban las células con el antagomiR-433, previniendo la expresión de α SMA dependiente de TGF- β 1 (Figura 51B).

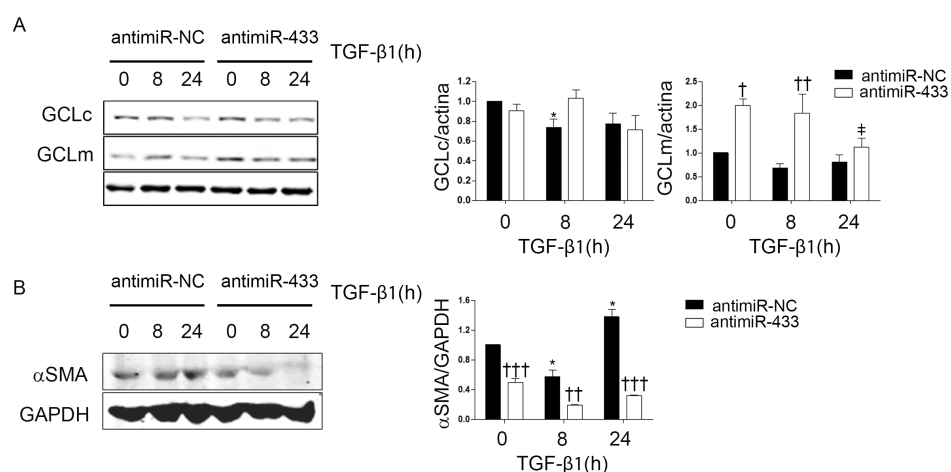


Figura 51: La inhibición de miR-433 previene la reducción de la expresión de GCL dependiente de TGF β 1 y la inducción del fenotipo fibrótico en células de origen hepático. A) Los niveles de proteína de GCLc y GCLm fueron analizados en células Huh7 transfectadas con antimiR (antimiR-NC) o antimiR-433 (ambos 40 nM, 48h) y tratadas o no (0h) con 5 ng/ml TGF- β 1 durante 8 y 24h. Los gráficos de barras representan el análisis densitométrico de la cuantificación de proteínas para ambas subunidades ($n \geq 3$, media \pm SEM). B) El western blot representa los niveles de expresión proteicos de la actina de músculo liso (α -SMA) en células Huh7 transfectadas con 40 nM antagomiR (48h) y tratadas con 5ng/ml TGF- β 1 durante 8 y 24 horas. El gráfico representa el análisis densitométrico de los niveles de proteína, media \pm SEM $n \geq 3$; * $p < 0,05$ respecto al control no tratado (antimiR-NC); $\pm p < 0,05$ respecto al antimiR-433 no tratado $\dagger p < 0,05$; $\dagger\dagger p < 0,01$; $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$ respecto al antimiR control en el tiempo correspondiente.

5.4.2 Fibrosis renal

El segundo modelo de fibrosis que se utilizó fue la obstrucción unilateral del uréter (UUO), que da lugar a una uropatía obstructiva de uno de los dos riñones, aboliendo su función debido al desarrollo de una fibrosis renal [342, 343]. Este proceso fibrótico está caracterizado por la activación de la vía de TGF β 1. Como muestra la Figura 52, encontramos que la expresión de ambas subunidades de GCL disminuyó significativamente en los riñones obstruidos después de 5, 10 y 15 días de UUO (Figura 52 A,B y C)

Resultados

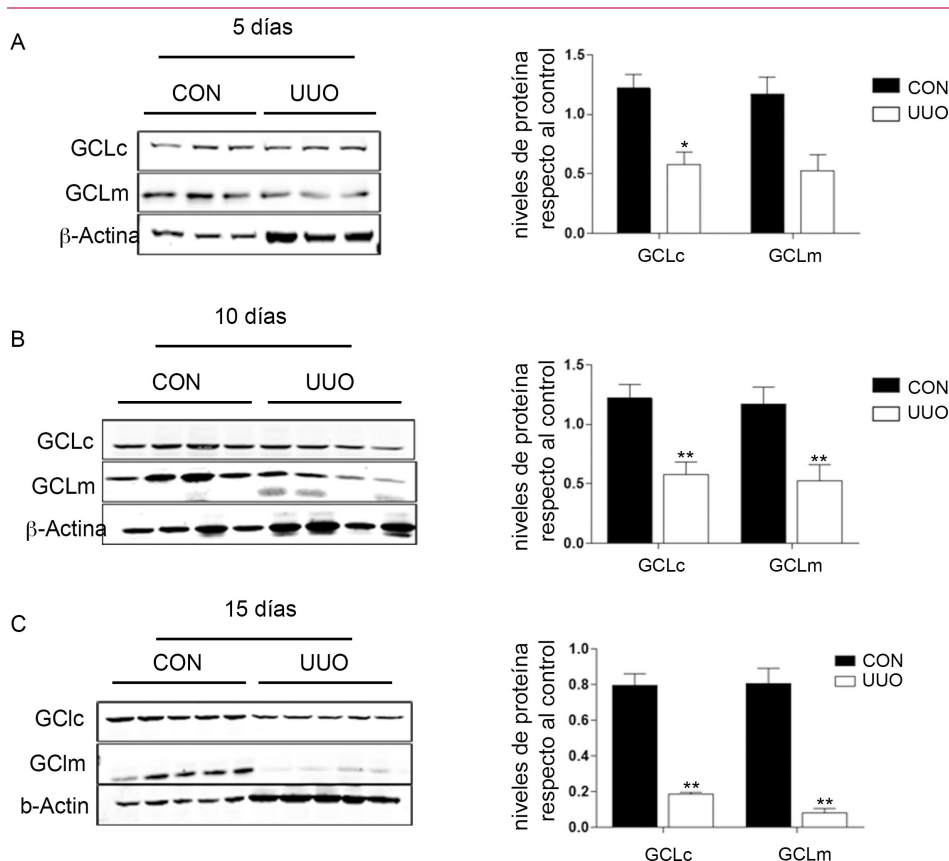


Figura 52: Caracterización de GCL en el modelo de fibrosis renal causado por UUO. Western blot representativo de los niveles de proteína de GCLc y GCLm en el modelo de uropatía obstructiva unilateral a 5 A) 10 B) y 15 días post-cirugía C), comparados con su riñón contralateral no obstruido (CON). Los gráficos de barras representan el análisis densitométrico de al menos 4 ratones de cada grupo (media \pm SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al riñón contralateral.

De acuerdo a lo esperado en un modelo fibrótico, tanto los niveles de TGF- β 1 y fibronectina se encontraron significativamente elevados respecto al control no obstruido a los 5 días post-cirugía (Figura 53).

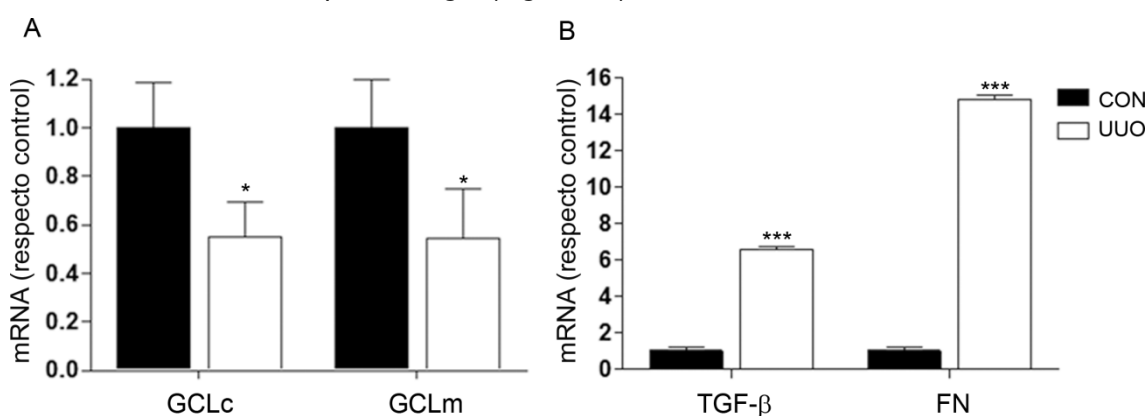


Figura 53: Caracterización de la expresión génica de GCL y marcadores fibróticos en el modelo de fibrosis renal UUO. A) Expresión génica de GCLc y GCLm a los 5 días después de la operación. B) Expresión de los marcadores fibróticos TGF- β , y fibronectina (FN) en UUO después de 5 días. Los gráficos de barras representan los niveles de expresión génica analizados mediante qPCR en los riñones contra lateral (CON) y obstruido (UUO, media \pm SEM, $n \geq 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al riñón contralateral.

Para evaluar el daño renal, se utilizaron dos biomarcadores, *Kim-1*, relacionado con la transición desde daño renal agudo a daño crónico [344, 345] y *Ngal*, un marcador temprano de enfermedad renal [346]. La expresión génica de *Ngal* y *Kim-1* aumentó a los 5 y 10 días después de la cirugía comparada con la expresión del riñón control (Figura 54).

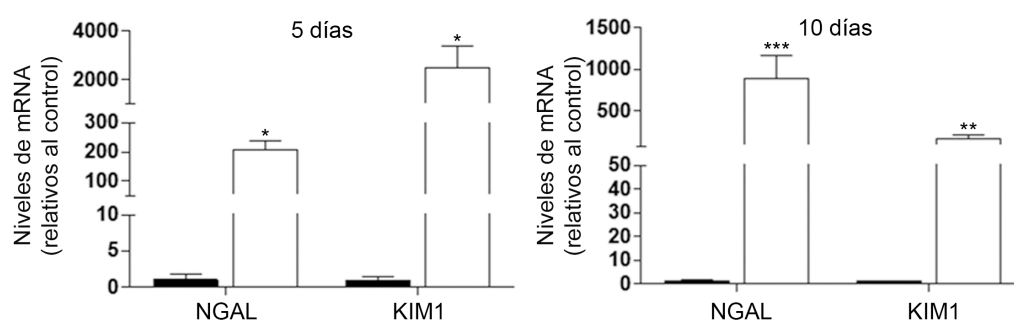


Figura 54: Caracterización de marcadores de daño renal en el modelo de UUO. Expresión génica de *Ngal* y *Kim-1* analizada mediante qPCR después de los tiempos indicados de UUO. Las gráficas muestran los resultados como media \pm SEM respecto a su riñón contralateral no obstruido, * $p < 0,05$ respecto al control.

De acuerdo con lo observado en modelos celulares los niveles de expresión de miR-433 también aumentaron de forma significativa en el riñón obstruido 5 días después de la cirugía (Figura 55), apoyando la hipótesis por la cual miR-433 estaría involucrado en la inhibición de la expresión de proteína y mRNA de GCL promovida por UUO.

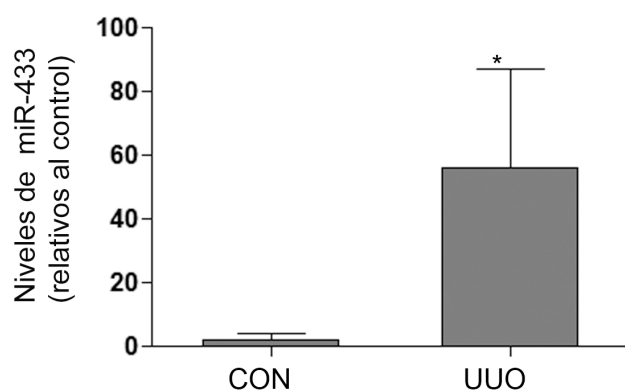


Figura 55: La expresión renal de miR-433 fue determinada por qPCR in el riñón contralateral (CON) o en el obstruido (UUO) después de 5 días post-cirugía. El gráfico de barras representa la cuantificación de los niveles de mRNA, media \pm SEM, $n \geq 3$; * $p < 0,05$ respecto al riñón contralateral.

En la línea celular de epitelio renal Hk2 observamos que el tratamiento con TGF- $\beta 1$, al igual que en el modelo celular hepático, tenía una tendencia a inhibir la expresión proteica de GCLc y GCLm. Dicho efecto fue revertido por el tratamiento con el antagonista anti-miR-433 (Figura 56).

Resultados

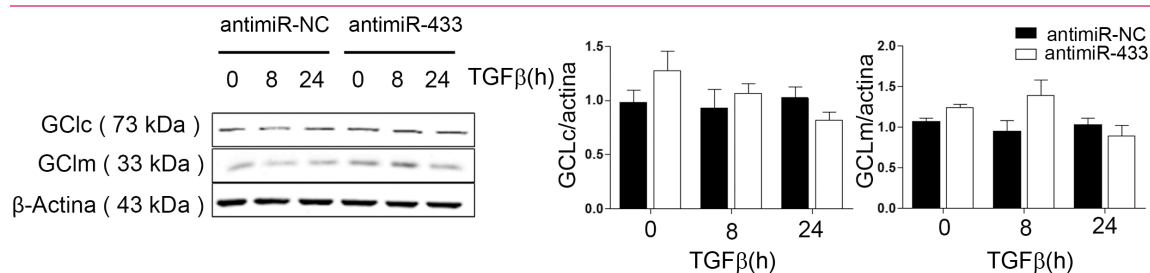


Figura 56: El antagonismo de miR-433 en un modelo celular renal previene la inhibición de la expresión de GCL. Los niveles de proteína de GCLc y GCLm fueron analizados en células Hk2 transfectadas con anti-miR control (anti-miR-NC) o anti-miR-433 (ambos 40 nM, 48h) y tratadas con 5 ng/ml TGF- β 1 durante los tiempos indicados. El gráfico de barras representa el análisis densitométrico de la cuantificación de proteínas para ambas subunidades ($n \geq 3$, media \pm SEM).

En conjunto estos resultados sugieren que en ambos modelos de fibrosis, el comportamiento biológico de miR-433 es similar en cuanto a la inhibición de GCL dependiente de TGF- β 1.

5.5 Caracterización de los niveles de expresión de miR-433 en modelos de sobreexpresión o inhibición estable de GCL

5.5.1 La sobreexpresión de miR-433 en un modelo de hepatocitos murinos inhibe la síntesis de GSH

Para estudiar si la sobreexpresión de miR-433 produce una inhibición funcional de GCL en un modelo celular de ratón se utilizaron dos líneas de células hepáticas de ratón. La primera, HEPA V, contiene un vector vacío y la segunda HEPA CR17 es una línea celular que sobreexpresa de forma estable ambas subunidades de GCL, siendo los niveles de proteína de GCLc y GCLm cuatro y dos veces superior al nivel de expresión en las células con el vector vacío, respectivamente (Figura 57A). En ambos tipos celulares se transfectó miR-433, observándose una tendencia a disminuir los niveles de GCLc y GCLm, similar a la obtenida en células humanas o bovinas. Cuando se transfectaron las células CR17 también se observó una ligera disminución de GCLc (Figura 57B yC).

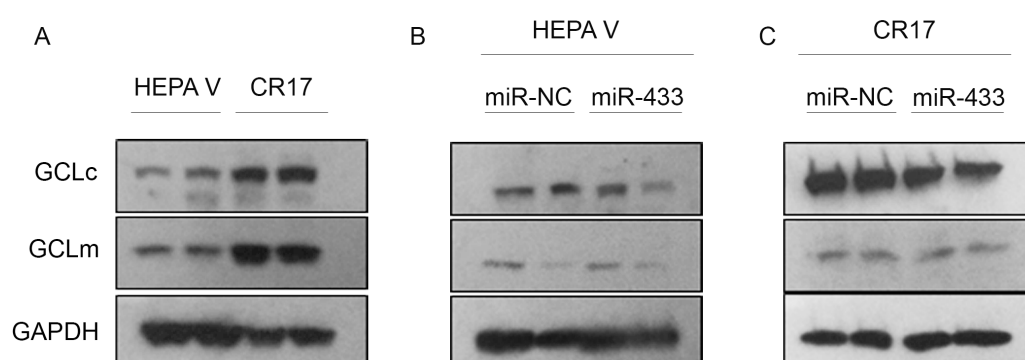


Figura 57: Efecto de miR-433 sobre los niveles de GCL en células de ratón. A) Western blot representativo de la expresión de proteína de GCLc y GCLm en las células control HEPA V y las estables de sobreexpresión CR17. B) Las células HEPA V se transfectaron con el microRNA control (miR-NC) o con miR-433 (60 nM, 48h). C) Se transfectaron las células HEPA CR17 con miR-NC o miR-433 (60 nM, 48h). La expresión proteica se analizó mediante western blot de GCLc, GCLm y GAPDH.

Para estudiar la efectividad de este silenciamiento, se determinaron los niveles del producto final de la síntesis, el GSH. Al igual que lo observado en el modelo humano y bovino, la sobreexpresión de miR-433 disminuyó el GSH total disponible en la célula. Esta disminución se produjo en las células HEPA V, reduciéndose significativamente en un 40% los niveles de GSH (Figura 58A). Además, también se observó una disminución en las células CR17, a pesar de que tienen una mayor expresión de

Resultados

GCLc y GCLm (Figura 58B). No fue posible determinar ningún cambio en la actividad de la enzima GCL en presencia de miR-433 utilizando esta metodología (Figura 58C).

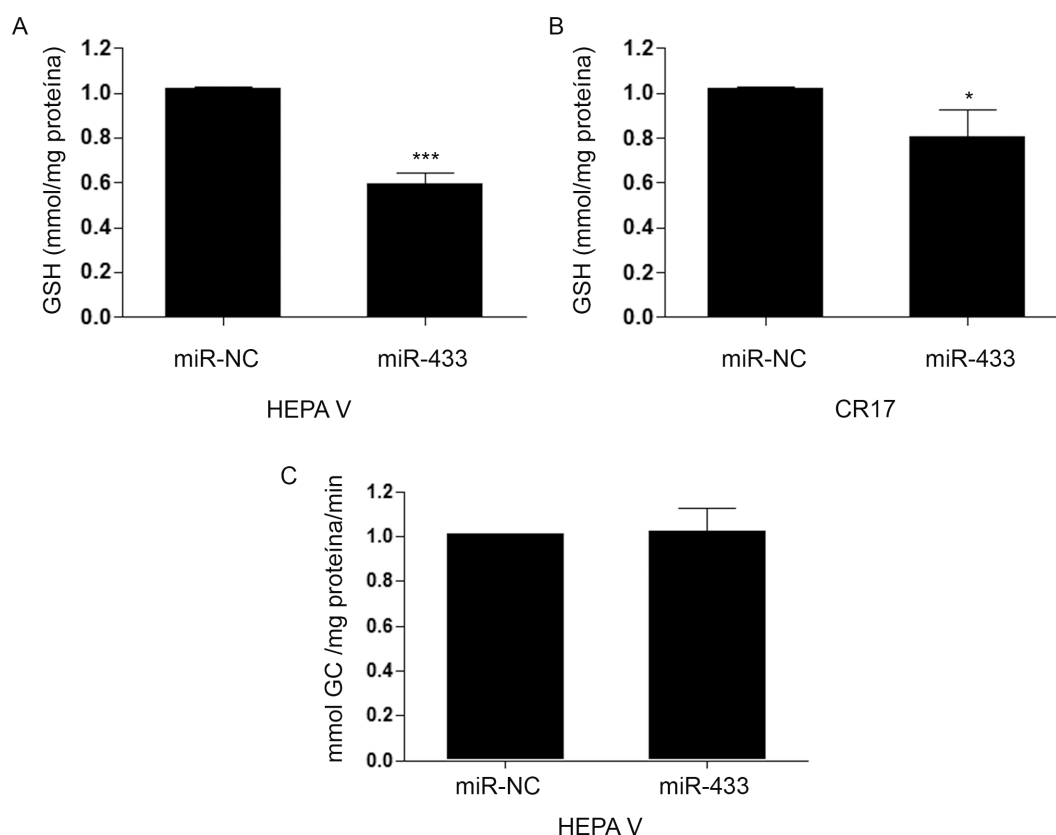


Figura 58: Niveles de GSH y actividad de GCL en presencia de miR-433. A) Las células HEPA V se transfectaron con miR-NC o miR-433 (60 nM, 48h). El gráfico representa los niveles de GSH total determinados con un método fluorimétrico dependiente de NDA (media \pm SEM, $n\geq 3$). B) Se sobreexpresó miR-NC y miR-433 en células HEPA CR17 (60 nM, 48 h). La gráfica representa el GSH total determinado por el ensayo fluorimétrico con NDA (media \pm SEM, $n\geq 3$). C) El gráfico de barras muestra la actividad de GCL en células HEPA V transfectadas con miR-NC o miR-433 (ambos 60 nM, 48h). La actividad fue estudiada por HPLC usando monobromobimano (MB) (media \pm SEM, $n=3$) * $p < 0, 05$; *** $p < 0,001$

Al igual que se analizaron los niveles de miR-433 en un sistema en el que se había deplecionado el GSH, se estudió la expresión de este microRNA en un modelo de ganancia de función de GSH. Para ello se aisló RNA de células HEPA V y HEPA CR17 y se analizó la expresión de miR-433 mediante PCR. Los niveles de expresión parecieron ser mayores en las células HEPA CR17, que sobreexpresan ambas subunidades, efecto contrario al observado en las células tratadas con L-BSO (Figura 59).

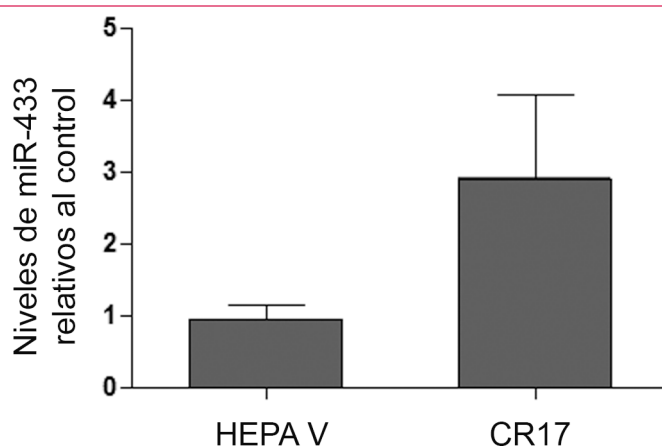


Figura 59: Expresión de miR-433 en presencia de exceso de GSH. Las células HEPA V y CR17 se cultivaron hasta un 70% de confluencia, entonces se lisaron y se aisló el RNA. El gráfico de barras muestra la expresión de miR-433 analizada mediante PCR a tiempo real (media \pm SEM, $n > 3$).

5.5.2 Efecto de la delección de la subunidad moduladora de GCL en ratón sobre la expresión de miR-433

Para analizar el efecto que la depleción de GSH ejerce sobre la expresión de miR-433 *in vivo*, se utilizó el modelo de ratón deficiente en GCLm [77, 347]. En muestras de hígado de estos ratones, se analizó la expresión de proteína de GCLc y GCLm. La expresión de GCLm en los animales KO fue nula, como cabía esperar. Sin embargo, como había sido descrito previamente los niveles de GCLc están aumentados para intentar compensar la pérdida de la subunidad moduladora (Figura 60).

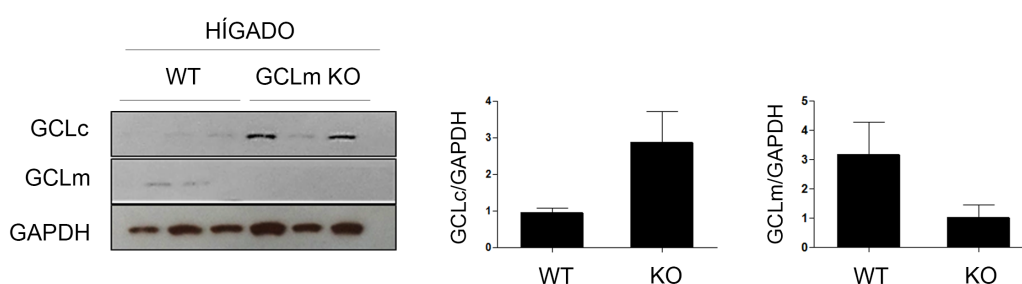


Figura 60: Expresión de GCLc y GCLm en muestras hepáticas de ratones control y deficientes en GCLm. EL western blot representa los niveles de expresión de proteína de GCLc y GCLm en lisados de hígado. Los gráficos de barras representan el análisis densitométrico de al menos 3 ratones (media \pm SEM).

El análisis de miR-433 por PCR cuantitativa que se muestra en la Figura 61, muestra cómo los niveles de miR-433 aumentan según disminuye la expresión de la subunidad moduladora de GCL, siendo significativamente mayores en el ratón KO para GCLm.

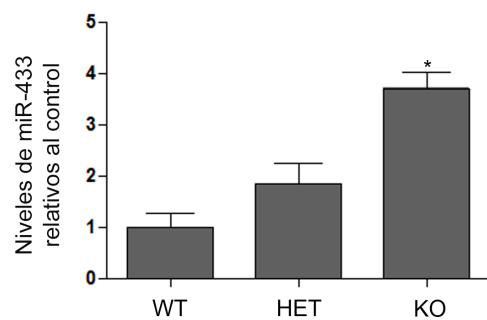


Figura 61: Efecto de depleción de GCLm in vivo sobre los niveles de miR-433. El gráfico muestra el análisis mediante PCR cuantitativa de RNA procedente de tejido hepático de ratones control (WT), haploinsuficientes (HET) y deficientes (KO) en GCLm (media \pm SEM, n=12), *p< 0,05.

5.6 Generación y caracterización del modelo murino de delección para GCLc específico de endotelio

Para estudiar el papel de GCLc de manera específica en el endotelio en un modelo *in vivo*, se generó un ratón modificado genéticamente con el alelo de GCLc suprimido de forma selectiva en el endotelio. Este se obtuvo cruzando el ratón Tie2-Cre, que expresa la recombinasa Cre bajo la expresión del promotor específico de endotelio Tie2, con el ratón que contiene la construcción recombinante con sitios loxP (GCLc f/f).

5.6.1 Ratón GCLc f/f

EL ratón Gclc f/f generado por el grupo de Dalton, TP et al en 2007 contiene una construcción diana para GCLc susceptible de ser recombinada por Cre [79]. Esta construcción fue amplificada mediante PCR y contiene un brazo corto del gen de Gclc con una porción del intrón 3 que incluye un cassette de resistencia a neomicina clonado en el sitio SacI del intrón 3 flanqueado por dos sitios loxP (Figura 62B) y un brazo largo de homología que contiene los exones 4,5 y 6 y parte del intrón 6. Además se le añadió un sitio loxP distal clonado en el sitio Bgl II del intrón 6. La construcción también contiene el gen de la timidina quinasa de herpes virus simple como marcador de selección negativa para eliminar las células que hayan sufrido algún tipo de recombinación no específica y la construcción se haya integrado en su genoma al azar. La construcción fue electroporada en células madre embrionarias, donde mediante recombinación homóloga se integró en el genoma. Los clones recombinados se seleccionaron mediante la resistencia a geneticina y ganciclovir, y los que fueron positivos se microinyectaron en blastocistos de ratones C57BL/6J. El ratón GCLc(f/f) que contiene la construcción recombinante (Figura 62C) se cruzó con el ratón Tie2-Cre para generar el ratón haploinsuficiente para GCLc. Con esta estrategia se pretendía que el alelo “floxeado”, es decir el que se encuentra flanqueado entre dos sitios loxP, se recombinara de forma específica en el endotelio generándose la construcción representada en la Figura 62D.

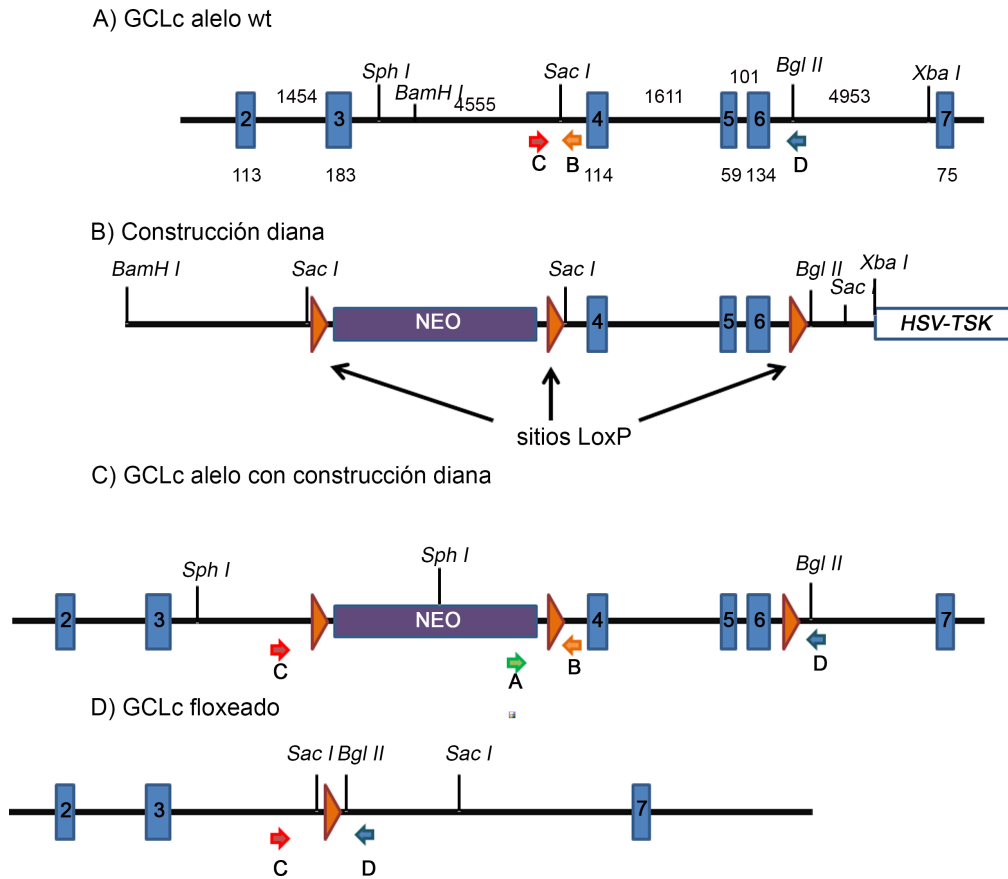


Figura 62: Generación del ratón “floxeado”. Esquema del alelo silvestre (wt), el alelo con la construcción recombinante (f) y el alelo recombinado (e), después de la acción de la recominasa Cre. A) Representación esquemática del gen de GCLC silvestre. B) Construcción diana con los exones del 3 al 6 de GCLC suprimidos, que contiene un cassette de neomicina para la selección positiva y el gen de la timidina quinasa para selección negativa y flanqueado con sitios LoxP para su posterior recombinación. C) Esquema del gen de GCLC modificado mediante recombinación homóloga con la construcción recombinante. D) Representación final del gen de GCLC recombinado carente de los exones 4, 5 y 6. Las flechas A(verde), B(naranja), C(roja) y D(azul) representan los sitios de apareamiento para los oligonucleótidos necesarios para el genotipado y caracterización del ratón GCLC (e/+). Adaptado de Chen, Y (2007), Hepatology.

5.6.2 Caracterización del ratón GCLC haploinsuficiente específico de endotelio.

Para caracterizar la expresión endotelial de GCLC se aislaron células MLEC de ratones controles GCLC(f/f) y de ratones heterocigotos GCLC(e/+) como se indica en materiales y métodos (97). La expresión de GCLC se redujo significativamente en los ratones heterocigotos, mientras que la expresión de GCLM no se modificó (Figura 63A). Para confirmar que la delección era específica de endotelio, también se analizó la expresión proteica de GCLC y GCLM en los fibroblastos pulmonares aislados de los mismos ratones, no observándose diferencias significativas de expresión entre los controles GCLC(f/f) y los heterocigotos GCLC(e/+) (Figura 63B).

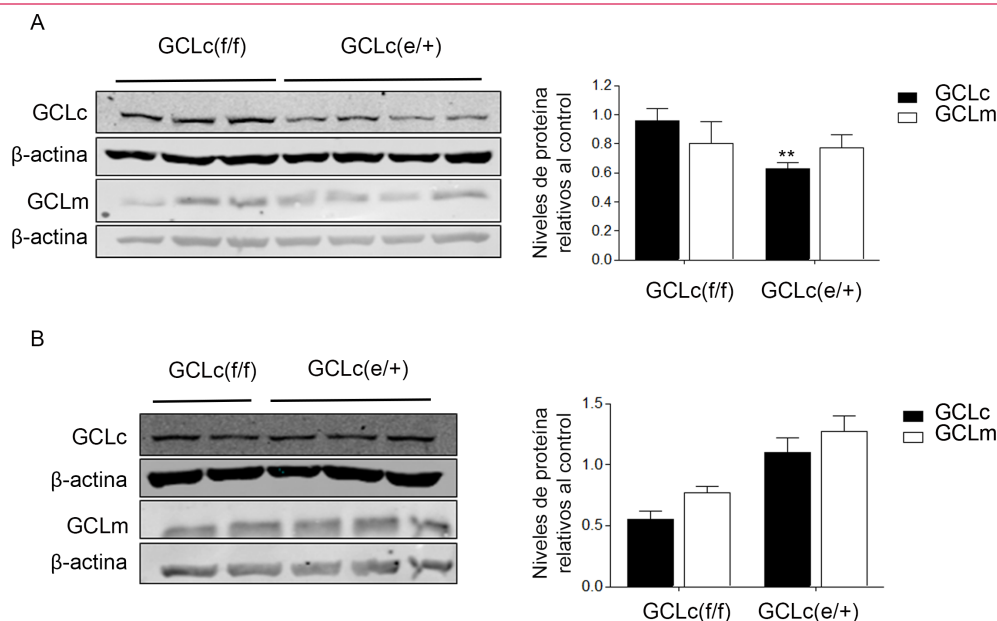


Figura 63: Expresión proteica de GCL en células endoteliales y fibroblastos aislados de ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+). A) Western blot representativo de GCLc y GCLm en células MLEC procedentes de distintos ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+). EL gráfico de barras representa el análisis densitométrico de ambos grupos de ratones (media±SEM, n≥6). B) El western blot representa la expresión de ambas subunidades de GCL en fibroblastos procedentes de pulmón de ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+). El histograma representa los valores medios del análisis densitométrico de GCLc y GCLm normalizados frente a β-actina (media±SEM, n≥6) **p<0,01 respecto a GCLc(f/f).

Para evaluar la funcionalidad endotelial de las MLEC aisladas de estos ratones se estudió la fosforilación de eNOS (S1177) dependiente de H₂O₂ (Figura 64). Se observó que mientras las células procedentes de ratones control GCLc(f/f) presentaban un aumento no significativo de la fosforilación dependiente del tiempo de exposición a peróxido de hidrógeno, las de los ratones GCLc(e/+) parecieron no responder al tratamiento.

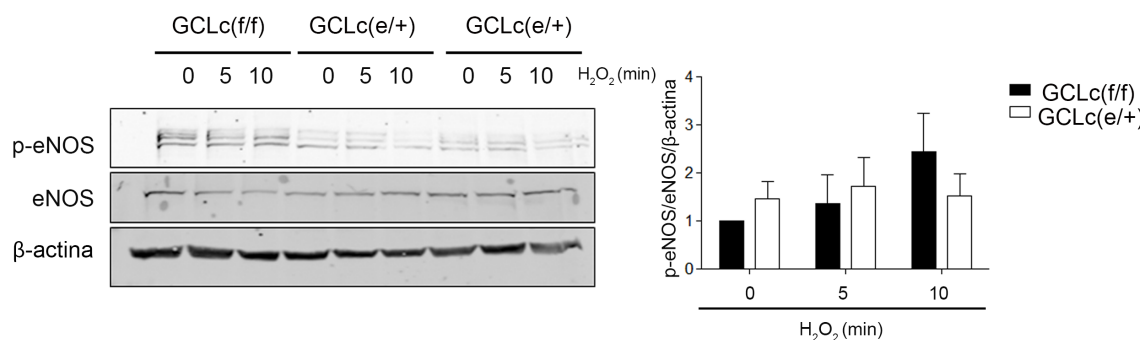


Figura 64: Efecto de la haploinsuficiencia de GCLc en MLEC sobre la activación de eNOS. Las células MLEC se mantuvieron sin FBS al menos 6h antes de ser tratadas con H₂O₂ (200 μM) durante los tiempos indicados y analizadas mediante western blot de p-eNOS (S1177) y eNOS total. El gráfico de barras (panel derecho) corresponde a la cuantificación del ratio p-eNOS/eNOS de una n≤6. tras corregir previamente con los niveles de β-actina.

Resultados

Por otro lado también se determinaron los niveles de GSH en las células endoteliales de estos ratones observándose una tendencia a disminuir los niveles de GSH reducido parcial muy interesante en las MLEC aisladas a partir de los ratones GCLC(e/+) (Figura 65A). Sin embargo la disminución de los niveles de GSSG no fue significativa (Figura 65B).

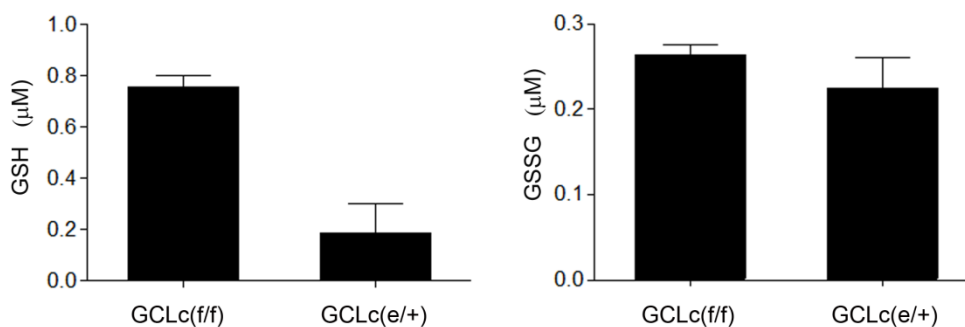


Figura 65: Inhibición de la síntesis de GSH en células de microvasculatura procedentes de pulmones de ratones haploinsuficientes para GCLC. A) Representación de los niveles de GSH reducido y B) representación de GSSG en MLEC de ratones GCLC(f/f) y GCLC(e/+). Los niveles de GSH (izquierda) y GSSG (derecha) fueron determinados según se indica en el apartado de materiales y métodos. Ambos gráficos representan la media \pm SEM de al menos 6 experimentos

Al ser estas células un nuevo modelo de depleción de GSH se estudiaron los niveles de miR-433 en ambos grupos de ratones, obteniéndose resultados semejantes a los observados en los modelos celulares endoteliales y hepáticos sometidos a estrés oxidativo y también a los analizados en hígados de ratones deficientes en GCLM. Como se puede observar en la siguiente figura, miR-433 parece tener una tendencia a disminuir en los ratones GCLC(e/+) deficientes en GCLC (Figura 66).

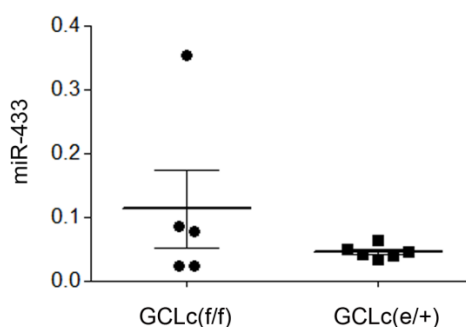


Figura 66: EL gráfico representa la media \pm SEM de los niveles de miR-433 cuantificados por qPCR en células endoteliales aisladas de ratones GCLC(f/f) y GCLC(e/+).

5.6.3 Análisis de la reactividad vascular en baño de órganos.

Para caracterizar si la haploinsuficiencia endotelial de GCLc es suficiente para producir disfunción endotelial, se aislaron arterias mesentéricas de ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+) y se sometieron a distintos ensayos en baño de órganos. La relajación dependiente de endotelio se estudió añadiendo concentraciones crecientes de acetilcolina y se observó que en arterias aisladas de machos GCLc(e/+) la relajación era menor que en sus correspondientes controles. Sin embargo en hembras del mismo genotipo no se obtuvieron cambios significativos (Figura 67A y B respectivamente).

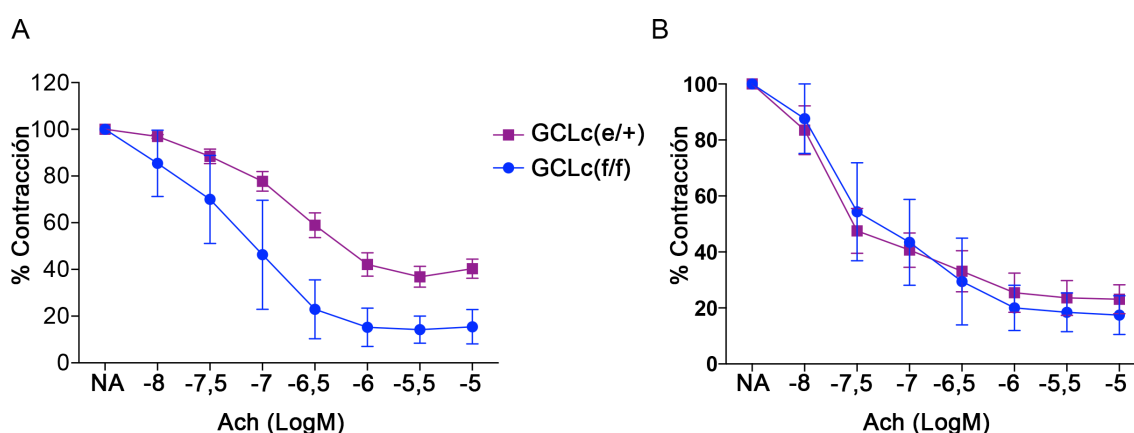


Figura 67: Ensayo de relajación vascular dependiente de endotelio. Diferentes segmentos de 300 μ m de arterias mesentéricas aisladas de ratones GCLc(f/f) y GCLc(e/+) se montaron en un miógrafo normalizándose todas ellas con su tensión óptima. Los vasos se contrajeron con NA 1 μ M y se estudió la relajación añadiendo concentraciones crecientes de Acetilcolina (Ach) (100 pM a 3 μ M). A) Ensayo de reactividad en ratones machos. B) Ensayo de reactividad vascular en hembras GCLc(e/+).

También se analizó la relajación no dependiente de endotelio utilizando en este caso concentraciones crecientes del donador de NO, nitroprusiato sódico. En este caso tanto en los ratones machos (Figura 68A) como en las hembras (Figura 68B) no se observaron diferencias significativas en cuanto a relajación.

Con la intención de revertir la disfunción endotelial en los ratones haploinsuficientes de GCLc, se utilizaron distintos tipos de tratamientos. Las arterias mesentéricas de estos ratones fueron preincubadas con tetrahidrobiopterina (HB₄), cofactor esencial de la eNOS, fundamental para la síntesis de NO. En la Figura 69 se puede observar que los ratones control GCLc(f/f) tratados con HB₄ mantenían el mismo perfil de relajación que los no tratados. Sin embargo los ratones haploinsuficientes GCLc(e/+) tratados con HB₄ recuperaban los niveles de relajación del control, observándose una menor disfunción respecto a los ratones GCLc(e/+) no tratados.

Resultados

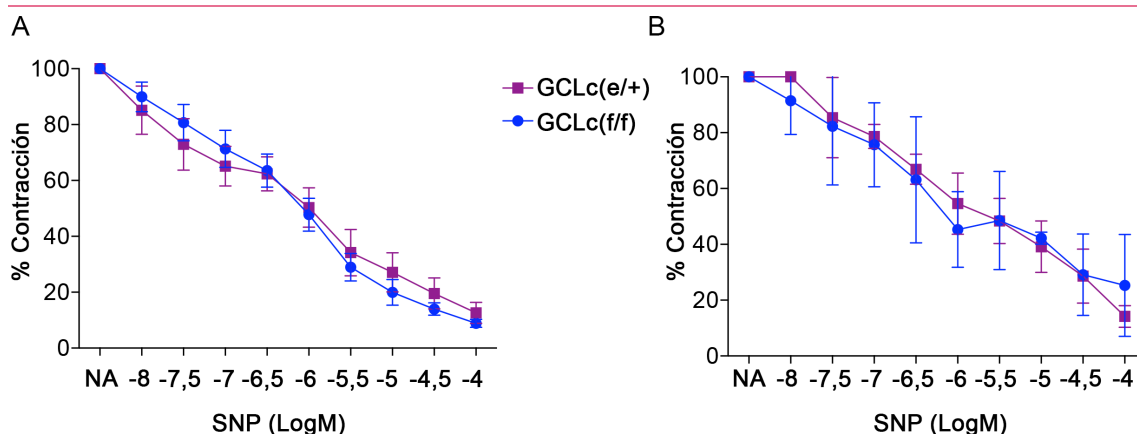


Figura 68: Relajación vascular independiente de endotelio. Los ensayos de relajación se realizaron sobre distintos segmentos de arteria mesentérica principal de 300 μm de longitud. Los vasos se contrajeron con NA 1 μM y se estudio su relajación añadiendo concentraciones crecientes de nitroprusiato sódico (SNP) (desde 100 pM a 3 μM). A) Relajacion en arterias aisladas de machos GCLc(f/f) y GCLc(e/+). B) Ensayo de reactividad en hembras control y haploinsuficientes.

También se intentó revertir el efecto observado en estos ratones utilizando tratamientos con antioxidantes, en este caso se utilizó NAC. En este caso sin embargo, no se apreciaron cambios significativos entre los ratones GCL(e/+) tratados con NAC y los no tratados (Figura 70).

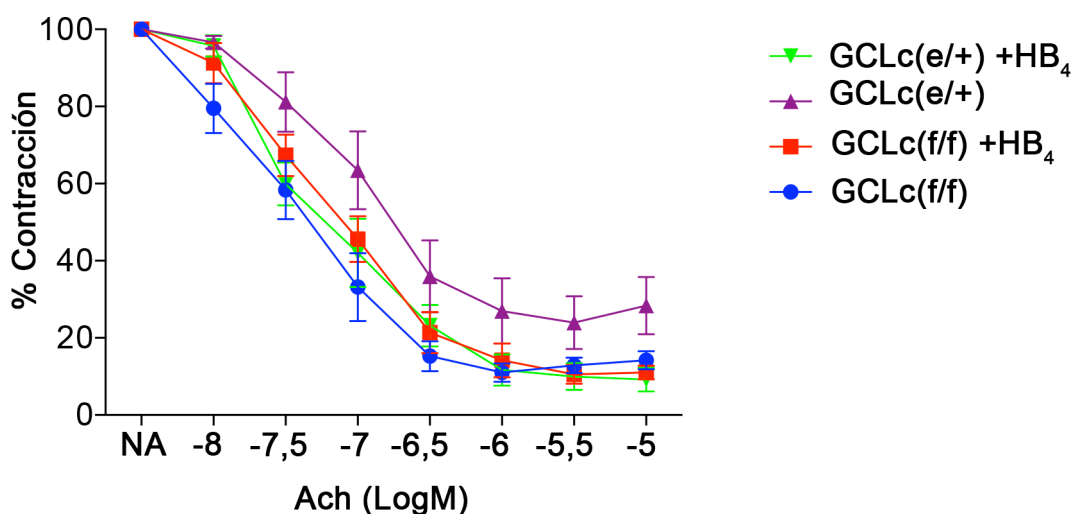


Figura 69: Ensayo de relajación vascular dependiente de endotelio. Diferentes segmentos de 300 μm de arterias mesentéricas aisladas de ratones machos GCLc(f/f) y GCLc(e/+) se montaron en un miógrafo normalizándose todas ellas con su tensión óptima. Tras preincubarse con tetrahidrobiopterina (HB₄) a 10⁻⁵ M, los vasos se contrajeron con NA 1 μM y se estudió la relajación añadiendo concentraciones crecientes de Acetilcolina (Ach) (100 pM a 3 μM). A) Ensayo de reactividad en ratones machos.

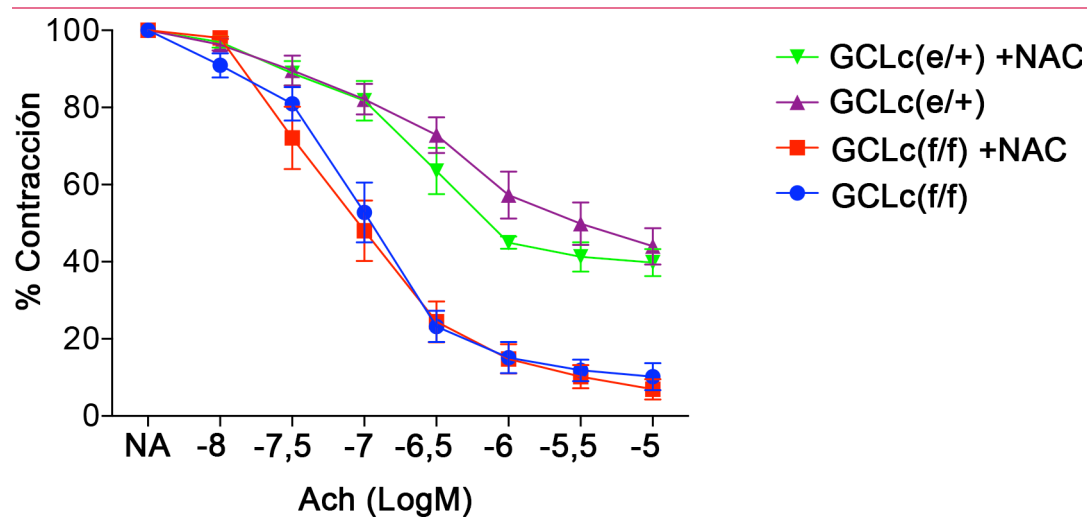
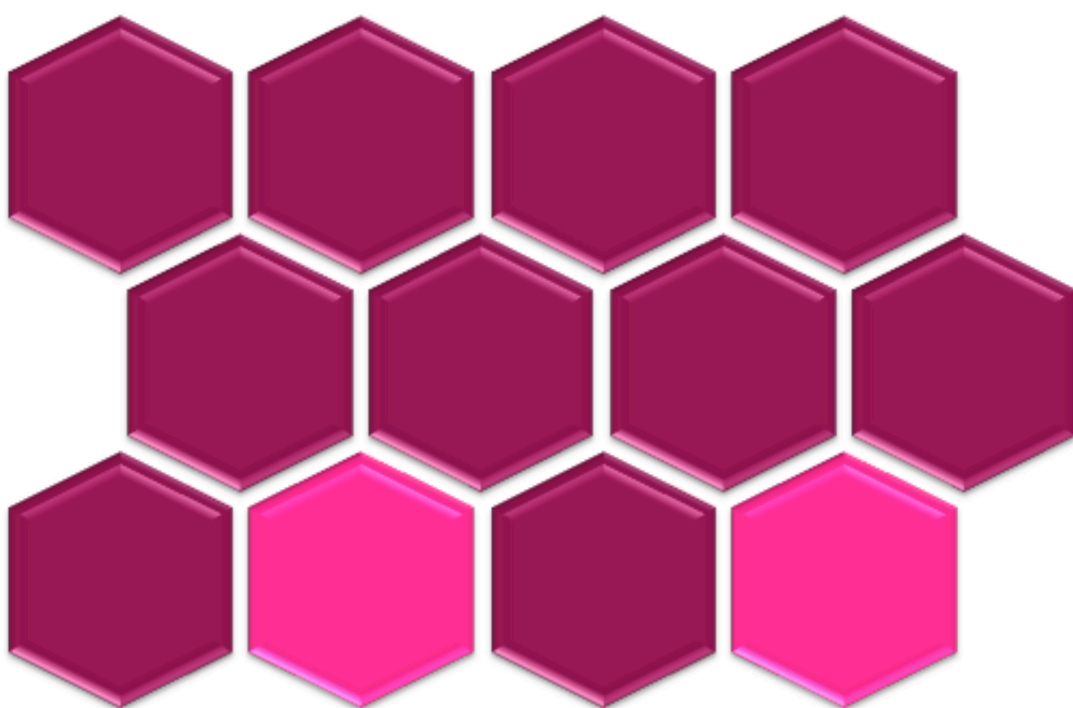


Figura 70: Ensayo de relajación vascular dependiente de endotelio. Diferentes segmentos de 300 μm de arterias mesentéricas aisladas de ratones machos GCLc(f/f) y GCLc(e/+) se montaron en un miógrafo normalizándose todas ellas con su tensión óptima. Tras preincubarse con N-acetilcisteína (NAC) 10^{-5}M , los vasos se contrajeron con NA $1\text{ }\mu\text{M}$ y se estudió la relajación añadiendo concentraciones crecientes de Acetilcolina (Ach) (100 pM a $3\text{ }\mu\text{M}$). A) Ensayo de reactividad en ratones machos..



Discusión

6. Discusión

La regulación transcripcional y post-transcripcional de GCL, enzima limitante de la síntesis del GSH, ha sido objeto de estudio y revisada ampliamente (2.2.1 Regulación de GCL). Sin embargo la información de su posible regulación por microRNAs es limitada y este ha sido el objetivo principal de la tesis. En la secuencia 3'-UTR humana de la subunidad catalítica GCLc se han identificado como microRNAs reguladores miR-1, miR-124, miR-133, miR-373 y miR-373* [348, 349] aunque no han sido validados *in celulo* o *in vivo*. Sin embargo para la subunidad moduladora no ha sido descrito ningún microRNA que actúe de forma directa sobre ella.

Es importante señalar que la regulación de los niveles de estas subunidades ha sido descrita en el contexto del estudio del efecto de algunos miRNAs sobre la vía Nrf2/ARE, como es el caso de miR-144, miR-34 o miR-153. Estos estudios [263, 276, 350, 351] demuestran por tanto una acción indirecta de los miRNAs. Además otras enzimas implicadas en la vía de activación de Nrf2, como Keap-1 o Bach1 pueden verse afectadas por microRNAs como miR-155 o miR-200, y en consecuencia alterar también la expresión de GCL [279, 352, 353].

6.1 Análisis *in silico* de las regiones 3'-UTR de GCLc y GCLm

Nosotros seleccionamos miR-433 como potencial microRNA candidato, entre los más de 200 microRNAs comunes a ambas regiones 3'-UTRs de GCLc y GCLm (Figura 19), debido a que tiene dos sitios de unión en cada uno de los 3'-UTRs de GCLc y GCLm respectivamente. Además uno de los sitios identificados en cada subunidad está altamente conservado y tiene un alto grado de apareamiento con miR-433 (Figura 20). Entre todos los candidatos ensayados en nuestro modelo endotelial en experimentos preliminares al desarrollo del trabajo, miR-433 fue el que mostró una mayor capacidad de silenciamiento después de ser sobreexpresado (Figura 24). Otro aspecto novedoso tiene que ver con la observación de que miR-433 disminuye la expresión de las dos subunidades de GCL de una manera independiente de Nrf2. Esta interpretación se sustenta en que cuando miR-433 se encuentra sobreexpresado en HUVEC, ni los niveles de mRNA ni de proteína del factor de transcripción Nrf2 se ven afectados (Figura 28). Sin embargo, en estas condiciones de sobreexpresión, miR-433 es suficiente para bloquear la respuesta transcripcional de Nrf2 sobre estas dos enzimas (Figura 26). Este resultado supone la primera descripción de una regulación directa de GCL por un microRNA, actuando tanto sobre la subunidad

catalítica como sobre la reguladora. Este efecto se traduce en una disminución de la expresión de proteína y RNA mensajero en aproximadamente un 50%, disminución que también se observó en los ensayos de luciferasa con las construcciones de las secuencias de los 3'-UTRs de cada subunidad. En el caso de GCLc no sólo se observó en la secuencia humana (Figura 21), sino también en la secuencia bovina (Figura 23). En el caso de la subunidad moduladora sólo uno de los sitios es funcional, siendo el otro lo suficientemente importante como para disminuir la actividad luciferasa (Figura 22) y la expresión proteica. Una de las posibles explicaciones de que este sitio de unión para miR-433 no sea funcional es que al tratarse de estructuras de RNA grandes y complejas, no sea fácilmente accesible para miR-433. A pesar de que los sitios de unión de miR-433 no están completamente conservados entre especies como ratón y vaca (Figura 20), nuestros resultados muestran que en distintos tipos celulares de estas especies la disminución en los niveles de proteína se mantiene. Ello sugiere que la regulación de miR-433 sobre GCL es un efecto conservado entre diferentes especies, dotando de mayor dimensión al papel fisiológico y fisiopatológico de la misma.

6.2 Regulación redox de miR-433

En conjunto nuestros resultados apoyan la noción de un papel regulador para Nrf2 sobre miR-433, ya que el silenciamiento de este factor reduce los niveles de este microRNA (Figura 40). Este resultado puede explicarse por una contrarregulación homeostática tendente a contrarrestar una reducción de los niveles de GSH y por tanto del tono nucleofílico celular mediante una supresión de factores que contribuyeran potencialmente a una inhibición de GCL [59]. El análisis de la región “promotora” de miR-433 comprendiendo aproximadamente 10 kb corriente arriba del inicio de la transcripción de miR-433, permitió identificar 8 posibles sitios de unión para Nrf2 (secuencias ARE) distribuidos en dos zonas (Tabla 16). Este dato permite especular sobre la importancia de un posible mecanismo transcripcional de regulación de la expresión de miR-433 mediado por Nrf2. Sin embargo el hecho de que en ninguno de los experimentos realizados (Figura 36, Figura 37, Figura 38 y Figura 39) donde se ha observado una respuesta de expresión génica a la activación de Nrf2, dicha respuesta se haya acompañado de un aumento de expresión de miR-433, permite especular sobre la escasa importancia de los sitios de regulación Nrf2/ARE en la región promotora del miRNA.

Tabla 16

Siete de estos sitios se encuentran a 9 kb del inicio de miR-433 y el otro se sitúa en una región entre 100 y 200 pb proximal al inicio de la transcripción (Figura 71).

Este dato permite especular sobre la importancia de un posible mecanismo transcripcional de regulación de la expresión de miR-433 mediado por Nrf2. Sin embargo el hecho de que en ninguno de los experimentos realizados (Figura 36, Figura 37, Figura 38 y Figura 39) donde se ha observado una respuesta de expresión génica a la activación de Nrf2, dicha respuesta se haya acompañado de un aumento de expresión de miR-433, permite especular sobre la escasa importancia de los sitios de regulación Nrf2/ARE en la región promotora del miRNA.

Tabla 16: Resultado de búsqueda de secuencias ARE en el promotor de miR-433

Secuencia	Coordenadas cromosómicas	
	Inicio	Fin
TGACGACG	100872440	100872447
TGAACTCG	100874138	100874145
TGAACTCG	100880934	100880941
TGA TGGCG	100872511	100872518
TGATGGCG	100872834	100874839
CGATGTCA	100874832	100873311
CGGAATCA	100873304	100872841
TGACGCCG	100872143	100872150

Los experimentos conducentes a un aumento del estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno se asociaron con una reducción de los niveles de miR-433 en células endoteliales. Esta represión también fue constatada con abordajes complementarios de reducción del tono nucleofílico (L-BSO).

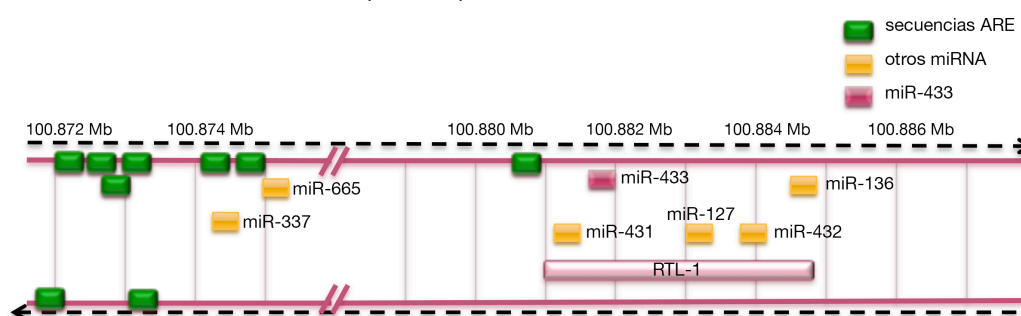


Figura 71: Esquema de la región promotora de miR-433. Análisis de 10.000 kb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción de miR-433, de la región Dlk1-Dio3 en el cromosoma 14 humano. En el esquema se diferencian dos posibles regiones de unión a Nrf2. La primera contiene 8 posibles secuencias ARE ,9 kb corriente arriba de miR-433 y la segunda región, contiene una posible secuencia ARE 200 pb corriente arriba, en el inicio de transcripción de miR-431. El análisis se realizó utilizando un script ad hoc en lenguaje Python para la búsqueda de los posibles sitios de unión de Nrf2.

Utilizando el modelo hepático Huh7 observamos que el ácido litocólico induce un aumento de la expresión de GCLc y GCLm, mediado por Nrf2 y también la disminución de miR-433 [6, 334, 354]. Todo ello apoya de nuevo la noción de que un desequilibrio en la homeostasis redox es contrarrestado por la célula a través de la represión de moléculas que promueven un descenso en el poder antioxidante endógeno.

6.3 miR-433 y disfunción endotelial

Nuestros resultados son consistentes con la idea de que la reducción de los niveles de GSH de manera dependiente de miR-433, produce cambios funcionales relacionados con la disfunción endotelial. Así, un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno genera un desequilibrio en el ratio 2GSH/GSSG favoreciendo la S-glutathionilación total y la específica de eNOS, lo que a su vez se correlaciona con una inhibición de la fosforilación activadora del residuo S1177 [69, 355]. Asimismo, el aumento de los niveles de la modificación post-traducciona en 3-Nitro-Tyr generada por SIN-1 se ve potenciado en HUVEC expuestas a miR-433 (Figura 32). Estos datos sugieren que la GCL es una enzima clave cuya funcionalidad es indispensable para una correcta función endotelial y una respuesta vascular adecuada.

Los datos observados *in vitro* en el modelo celular HUVEC son consistentes con los observados en el modelo de ratón haploinsuficiente para GCLc, donde al igual que en el ratón deficiente para GCLm se observa una clara disfunción endotelial representada por una menor relajación en respuesta a acetilcolina, que no se observó cuando se utilizó el vasodilatador nitroprusiato sódico, cuya acción es independiente del endotelio. Además en células endoteliales aisladas de estos ratones se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en HUVEC transfectadas con miR-433 o en experimentos con VEGF en HUVEC tratadas con inhibidores de GCLc como un siRNA específico o L-BSO, indicando que el correcto funcionamiento y control del estado redox, reflejado en el ratio 2GSH/GSSG, es necesario para una adecuada respuesta vascular y que una depleción en este sistema disminuye la señalización de eNOS. También se observó que las arterias procedentes de los ratones haploinsuficientes que fueron tratadas con el cofactor HB₄, mejoraban su respuesta a dosis crecientes de ACh (resultado discutido más adelante).

6.4 Regulación de miR-433 por GSH

Dado que no existe un modelo murino viable deficiente para todos los tejidos en la subunidad catalítica de GCL, varios grupos han estudiado el ratón con deficiencia de GCLm como modelo para los estudios *in vivo* y también para caracterizar ciertas patologías humanas relacionadas con polimorfismos en este gen (ver apartados siguientes de la discusión). Nosotros tuvimos la oportunidad de estudiar el tejido hepático procedente de estos ratones. En este caso, a pesar del claro aumento del estrés oxidativo y la depleción de GSH, tanto miR-433 como GCLc se encuentran aumentados. Aunque no disponemos de una explicación obvia para este resultado es posible que refleje respuestas homeostáticas contrapuestas, de modo que por una parte el hígado compense el déficit de una subunidad de GCL aumentando la otra y por otra el propio daño tisular hepático dispare la activación de vías proinflamatorias, entre las que pudiera estar TGF- β , que regulen al alza los niveles de microRNA. En los experimentos encaminados a estudiar el efecto del aumento de GSH sobre miR-433 mediante sobreexpresión de GCL, pudimos verificar el aumento de aquel en células hepáticas, confirmando la validez de la sobreexpresión. Sin embargo, no detectamos ningún efecto sobre el microRNA. Es posible que un aumento per se del glutatión sin repercusión evidente sobre el ratio 2GSH/GSSG no module directamente la expresión del miR-433.

6.5 miR-433 y regulación transcripcional

miR-433 se encuentra codificado por el cluster DLK1-DIO3 localizado en el cromosoma 14 en humanos y está regulado transcripcionalmente a distintos niveles y por diversos factores de transcripción [298, 299]. Por ejemplo, el factor de transcripción MEF2A implicado en la regeneración del músculo esquelético en adultos, es capaz de aumentar la expresión de los microRNAs presentes en este megacluster, siendo además este factor de transcripción regulado por el propio miR-433 [301]. Sin embargo miR-433 y otro de los microRNAs presentes en este cluster, miR-127, se encuentran codificados por regiones génicas solapantes y pueden ser co-regulados por receptores nucleares como SHP y ERR γ [303, 304]. Estos trabajos describen como en el modelo de células HEPA-1 tratadas con 17- β -estradiol u otros agonistas de estrógenos, como GSK4716, se observa un aumento en la expresión tanto de miR-433 como de miR-127. La sobreexpresión de SHP reprimía sin embargo el aumento de estos microRNAs.

Nuestros resultados *in vitro* en experimentos de actividad luciferasa acoplada al 3'-UTR bovino de GCLc en presencia de diferentes concentraciones de 17- β -estradiol o GSK4716, confirman y validan la regulación de miR-433 por estrógenos y la regulación específica sobre GCLc. Así, el tratamiento con estrógenos disminuye la actividad luciferasa, revirtiéndose dicho efecto por la presencia de antimiR-433. Se observó una disminución de GSH y de expresión proteica de GCLc dependiente de 17- β -estradiol en BAEC, que fue también reproducible en HUVEC en cuanto a niveles de mRNA. Esta disminución es opuesta a la descrita en la bibliografía, pero concuerda con la disminución de actividad observada en el ensayo de luciferasa. Sorprendentemente el análisis por PCR cuantitativa mostró que la expresión de miR-433 en presencia de 17- β -estradiol era significativamente menor.

Se sabe además que la expresión de estrógenos está relacionada con un efecto beneficioso a través de mecanismos antioxidantes. Así, tratamientos *in vitro* con 17- β -estradiol activan la translocación al núcleo de Nrf2 aumentando la expresión, no sólo de GCLc sino de otras enzimas de fase II como HO-1 [356, 357], en contraste con la disminución de GCLc y GCLm que hemos observado en nuestro modelo, contraria también a la disminución de miR-433, por lo cual habría que analizar los posibles errores del modelo y que dos mecanismos están regulando de forma independiente y contraria a miR-433 y a GCL.

Es probable que el feed-back entre el estímulo estrogénico, la respuesta redox y los niveles de miRNA sea complejo. En general los datos presentados en esta tesis apoyan la idea de que un aumento del estrés oxidativo contribuye a reprimir la expresión del miRNA, de acuerdo con una respuesta homeostática (ver más adelante). Al no haber estudiado el efecto de los estrógenos sobre el estado redox resulta difícil especular constructivamente sobre este problema.

6.6 La importancia del GSH en la disfunción endotelial

El importante papel del balance redox y su desequilibrio observado en patologías como la disfunción vascular y endotelial es bien conocido y ha sido estudiado en profundidad durante los últimos 20 años [154, 358]. La sobreexpresión de miR-433 produce una disminución de los niveles de GSH, como consecuencia del efecto silenciador sobre GCL. Varios trabajos han mostrado que la reducción de GSH y en general de los niveles de antioxidantes endógenos generan disfunción endotelial [69, 338, 355]. Esto ha sido evidenciado recientemente en el modelo murino deficiente en la subunidad moduladora de GCL [81]. Los autores de este estudio concluyen que la

haploinsuficiencia de GCLm está asociada con la alteración en las medidas de reactividad vascular en un ensayo clásico en baño de órganos, donde las aortas previamente sometidas a contracción con fenilefrina, mostraron una menor vasodilatación en respuesta a ACh. La deficiencia completa de GCLm estaba asociada a un aumento en la relajación vascular, pero con una sensibilidad exacerbada a estímulos vasoconstrictores, dato que apoya que es necesaria una concentración de GSH dentro de un rango preciso para una respuesta homeostática correcta.

El enzima eNOS es un regulador crítico en la regulación de la homeostasis vascular debido a la generación de NO que es dependiente, entre otros, del cofactor tetrahidrobiopterina (HB₄). Cuando este factor no se encuentra disponible se produce el desacoplamiento de eNOS y la generación de superóxido, siendo además esta enzima más susceptible de ser S-glutationilada [359, 360]. Tal y como se ha comentado anteriormente la regulación mediante S-glutationilación de eNOS también produce la inhibición de la síntesis de NO también mediante un mecanismo de desacoplamiento [69]. La disminución de la biodisponibilidad de NO y la producción de superóxido derivada del desacoplamiento de eNOS es un fenómeno inherente a la disfunción endotelial y al daño vascular [361]. Es verosímil que la reversión de la disfunción endotelial por HB₄ en el modelo de haploinsuficiencia de GCLc tenga que ver con una reducción parcial del desacoplamiento de eNOS asociado a un aumento de la S-glutationilación de la misma promovido por la síntesis de glutatión. Así la HB₄ por un mecanismo alternativo contribuiría a reducir los niveles de superóxido y a la mejor relajación vascular observada. Esta interpretación estaría de acuerdo con lo propuesto por algunos autores en relación con las funciones integradas de la HB₄ y la S-glutationilación como sensores y efectores de la regulación redox de eNOS, siendo ambos mecanismos de forma independiente capaces de desacoplar eNOS, pero siendo la deficiencia en HB₄ un factor clave para exacerbar la S-glutationilación de la enzima [355].

6.7 miR-433: el nexo entre TGF- β y la inhibición de la síntesis de GSH

Tal y como se ha intentado reflejar en la introducción de esta tesis, un aspecto fascinante de la biología redox es su relación con el proceso de fibrogénesis. La interacción entre citoquinas profibróticas como el TGF- β y las especies reactivas de oxígeno está bien establecida. Existen distintas hipótesis que sostienen que un

aumento en el estrés oxidativo en la célula desempeña un importante papel en el desarrollo fibrótico en humanos tanto en la fibrosis pulmonar, como en el daño hepático. Igualmente, en la fibrosis renal, aunque las causas primarias son diferentes, el incremento del estrés oxidativo es una característica general que contribuye ampliamente al desarrollo de la enfermedad. TGF- β puede estimular la producción de especies reactivas de oxígeno aumentando la expresión de NOX4 [362, 363] y también es capaz de aumentar la producción de especies reactivas mitocondriales debido a la disminución en la actividad del complejo IV [364]. En distintos modelos de fibrosis se ha observado la disminución en la síntesis de GSH debida a la inhibición de la expresión transcripcional de ambas subunidades de la GCL. Ramani y cols en 2012 mostraron cómo la sumoilación de los factores de transcripción del heterodímero Nrf2-MafG puede modular la unión de éste a los sitios ARE presentes en los promotores de GCLc y GCLm en las células estrelladas hepáticas en modelos fibróticos *in vivo* inducidos por la ligadura del conducto biliar. Esto se debe a que el daño colestático favorece la unión del heterodímero formado por MafG y Mafc a los sitios ARE en lugar de la unión del heterodímero MafG-Nrf2 [339]. Este mismo grupo propone además una regulación sobre Nrf2 también mediada por microRNAs. En el caso de miR-27 se activa su expresión por el daño colestático y ello inhibe la expresión de Nrf2 y Prohibitina-1. Esta proteína, implicada principalmente en función mitocondrial, proliferación y desarrollo [365], puede también actuar como co-activadora en la respuesta antioxidante disminuyendo aún más la respuesta transcripcional [366].

Así la expresión de GCLc y GCLm en el desarrollo fibrótico está sujeta a una doble regulación. Los estímulos pro-inflamatorios y pro-fibrogénicos desencadenan una respuesta protectora mediada por una activación de la ruta Nrf2/ARE dependiente de ROS, respuesta que promueve un incremento de la expresión de GCL como mecanismo homeostático. Sin embargo esos mismos estímulos, entre los que se encuentra TGF- β , son capaces de aumentar los niveles de microRNAs inhibitorios, actuando bien mediante una represión de Nrf2/ARE bien directamente sobre la degradación del mRNA de GCL, como es el caso de miR-433 (Figura 72).

La reciente descripción de miR-433 como un miRNA profibrótico [305] estimuló nuestro interés y deseo de explorar sus efectos sobre GCL en un contexto de fibrosis. Utilizando dos modelos experimentales de fibrosis *in vivo*, en el riñón y en el hígado, ligadura unilateral de uréter (UUO) y de conducto biliar (BDL) respectivamente, confirmamos la represión de la expresión de ambas subunidades de GCL en

condiciones de fibrosis a distintos tiempos post-cirugía, guardando siempre correlación con el aumento de miR-433 (Figura 49 y Figura 52).

En el modelo celular hepático Huh7 comprobamos que el tratamiento con TGF- β 1 a 24 y 48 horas, es capaz de disminuir de forma significativa la expresión de GCL y la síntesis de GSH, hechos que se correlacionan con un aumento de miR-433 (Figura 50).

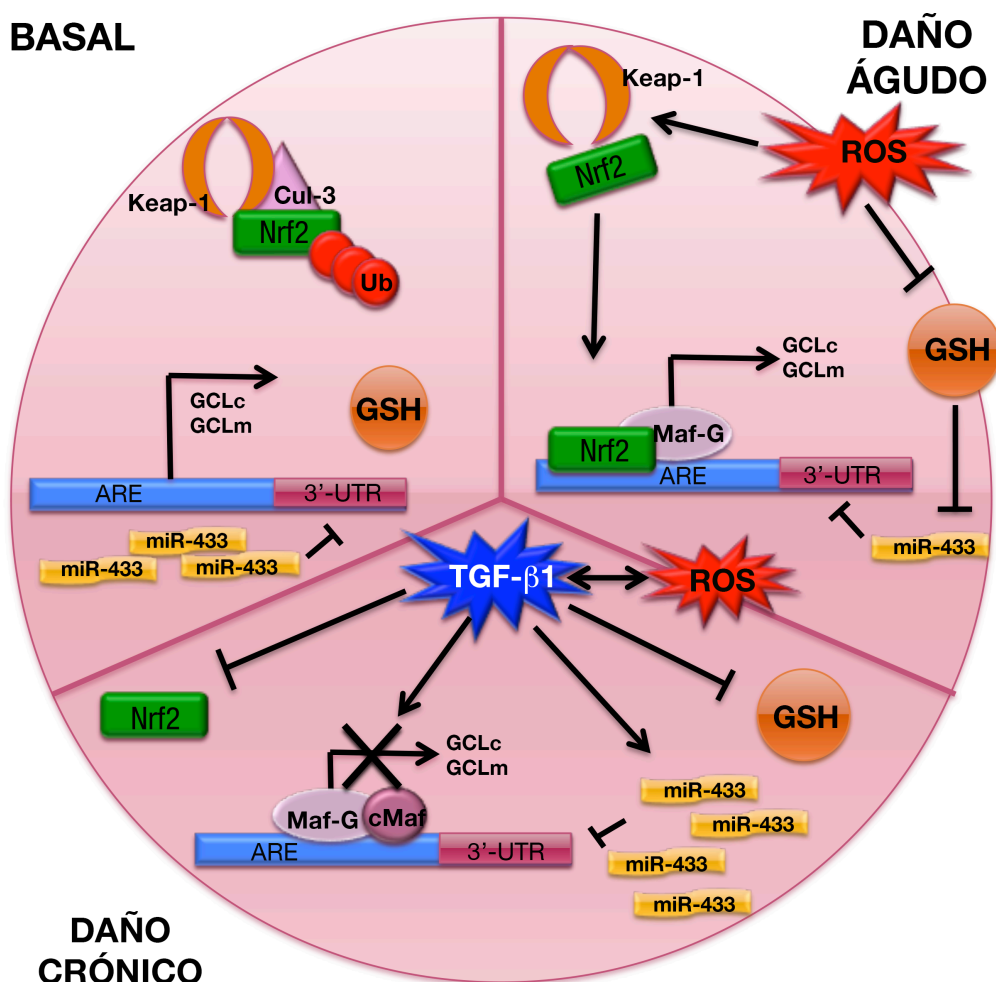


Figura 72: miR-433 es susceptible de ser regulado por ROS y TGF- β . En condiciones basales Nrf2 está secuestrado por Keap1 y es marcado con ubiquitina para ser degradado vía proteosoma, miR-433 está presente y la expresión de GCLc y GCLm basal es estable. Cuando la célula sufre un daño puntual, el aumento de ROS induce la activación de la vía de Nrf2, mediador clave en la expresión de GCL, y a su vez reduce los niveles de GSH y miR-433. Cuando el daño es persistente, como es el caso de un daño fibrótico en presencia de TGF- β , la vía Nrf2 se ve inhibida y los sitios ARE en el promotor se ven bloqueados por heterodímeros de proteínas Maf pequeñas. Por otro lado, ROS y TGF- β son reciprocamente regulados. Un aumento en la activación de la vía de TGF- β elevando los niveles de miR-433 disminuyendo GCLc y GCLm, contribuyendo por tanto a la reducción de los niveles de GSH y el tono nucleófilo.

Por el contrario, cuando bloqueamos el aumento de miR-433 producido en respuesta a TGF- β , no sólo desaparece la reducción de GCLc y GCLm producida por el tratamiento con TGF- β , sino que además ello se traduce en una menor expresión de

marcadores profibrogénicos como α SMA. Ello apoya un papel profibrogénico de miR-433 a través de la regulación de GCLC y GCLm, y pone en el punto de mira a este microRNA como potencial diana terapéutica para la prevención del desarrollo de fibrosis (Figura 51). En el caso de las células renales HK2 también se observó la misma tendencia que en el modelo hepático *in vitro*, aunque el efecto del antimiR no resultó estadísticamente significativo.

Con estos datos mostramos que la depleción de GSH y el aumento del estrés oxidativo son esenciales para el desarrollo de la fibrosis. Por tanto puede sostenerse que el aumento en la señalización de TGF- β propio del estímulo inflamatorio profibrótico no sólo promueve cambios en el estado redox mediante diversos mecanismos conocidos como la inactivación de la vía Nrf2/ARE, sino también induciendo la expresión de microRNAs represores de la ruta de síntesis de GSH. En concreto los datos aquí presentados permiten proponer un modelo en el cual TGF- β 1 disminuye la expresión de GCL y los niveles de GSH de forma específica a través del aumento de miR-433.

El desarrollo de fibrosis sugiere que estas respuestas mantienen un curso temporal bifásico. En un estadio temprano de daño, la expresión de GCL aumentaría de forma rápida, debido a la activación del factor de transcripción Nrf2. Sin embargo cuando la exposición al daño persiste, como sucede en los procesos fibróticos dependientes de TGF- β 1, la expresión de miR-433 aumentaría de forma progresiva, reduciendo los niveles de expresión de GCL y por tanto los niveles de la síntesis de GSH. Todo ello contribuiría a reducir el tono nucleofílico celular limitando también la expresión de miR-433. Sin embargo, un daño persistente conduce a un desbalance de modo que la respuesta homeostática protectora fracasa favoreciéndose el desarrollo de fibrosis.

Recientemente se ha propuesto el término “redoximiR” para describir un conjunto de microRNAs que participan en la respuesta redox como moléculas reguladoras directas de la expresión post-transcripcional de diferentes vías o como moduladores indirectos de la respuesta homeostática redox [268]. El término “fibromiR” también ha sido acuñado para designar aquellos microRNAs que regulan la fibrogénesis a través de distintos mecanismos [292]. La caracterización de miR-433 aquí presentada permite postular su pertenencia a ambos subgrupos, dada su capacidad de regular tanto los niveles de GCL, enzima esencial para producir una adecuada respuesta redox celular, como también la fibrogénesis [26]. Es verosímil que existan más miRNAs comunes a ambos conjuntos y estudios futuros en modelos diversos de fibrosis orgánica deben permitir identificarlos y confirmar su doble papel.

6.8 Perspectivas

Aunque creemos que el papel inhibitorio de miR-433 sobre GCL y la síntesis de GSH queda razonablemente demostrado, este trabajo abre puertas para explorarlo con mayor detalle. Así, tanto la sobreexpresión como la inhibición *in vivo* de miR-433 pueden resultar modelos útiles para corroborar el papel fisiopatológico de este miRNA. En tejido vascular, lograr la sobre-expresión o represión, siquiera *ex vivo*, en arterias permitiría comprobar su papel directo en la disfunción endotelial asociada a depleción de GSH, tanto en ratones silvestres como en aquellos modificados genéticamente, tales como los descritos en esta tesis.

Para validar o descartar la implicación de Nrf2 en la regulación de miR-433 sería necesario un abordaje detallado que incluyera al menos el estudio de las secuencias reguladoras mediante actividad luciferasa o el análisis de la unión directa de Nrf2 mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina.

El modelo de inhibición de miR-433 en fibrosis renal ha sido analizado en cuanto a los efectos sobre el proceso fibrótico *in vivo* [305], pero no sobre la ruta de síntesis de GSH y los niveles de estrés oxidativo. El nexo patogénico aportado por miR-433 hace interesante explorarlo en este mismo contexto. En el modelo hepático, que sepamos, no hay ningún dato sobre el papel de miR-433 y el desarrollo de fibrosis hepática. Además los estudios *in vivo* pueden contribuir a identificar miR-433 como una diana terapéutica o biomarcador en procesos fibróticos. En esta línea, en nuestro laboratorio se ha comenzado un análisis en diferentes pacientes con daño renal crónico o con esteatosis de origen no alcohólico, en los que se verificó previamente un nivel de estrés oxidativo elevado. El número de pacientes estudiado es aun escaso y por ello no ha resultado posible incluir los datos preliminares en esta memoria.

Finalmente, estamos desarrollando el modelo de fibrosis renal en los ratones haploinsuficientes para GCLc en endotelio con el fin de conocer la importancia de los niveles de GSH y eventualmente de miR-433 sobre el desarrollo y progreso de la fibrosis.

Consideramos que estas son sólo algunas de las nuevas cuestiones que este trabajo suscita acerca del papel fisiológico de miR-433, que podrán ser contestadas mediante distintos abordajes en un futuro próximo.

Conclusiones



7. Conclusiones

1. miR-433 es el primer microRNA regulador de ambas subunidades de GCL que actúa de forma directa e independiente de Nrf2 siendo capaz de inhibir la síntesis de GSH en distintos modelos celulares.
2. La sobreexpresión de miR-433 en células endoteliales es capaz de inducir un aumento de estrés oxidativo y producir una disminución en la activación de eNOS inhibiendo y desacoplando la enzima favoreciendo en el endotelio modificaciones post-traduccionales dependientes del estado redox, como S-glutathionilación y nitración de tirosinas.
3. miR-433 es un microRNA regulado por el estado redox cuya expresión se reduce por daño oxidativo como la depleción de GSH o el tratamiento con moléculas pro-oxidantes.
4. Aunque miR-433 no es un microRNA regulador de la expresión de Nrf2, la presencia de este factor de transcripción sí es clave para la expresión de miR-433.
5. El aumento de miR-433 dependiente de TGF- β -1 en diferentes modelos pro-fibróticos (ligadura de conducto biliar y ligadura unilateral de uréter) es causante tanto de la disminución de GCLc como de la GCLm y de la síntesis de GSH. Este efecto se ve revertido por el inhibidor de miR-433.
6. miR-433 es un microRNA con una regulación diferente y dependiente de la prevalencia del estímulo al que esté expuesto, que puede encontrarse inhibido favoreciendo la respuesta antioxidante, cuando se encuentra frente a estímulos pre-oxidantes o sobreexpresado amplificando el daño y disminuyendo los niveles de GCL y GSH en el desarrollo fibrótico.
7. La subunidad GCLc es crítica para una correcta función endotelial tal y como se pone de manifiesto en el modelo de haploinsuficiencia específicamente endotelial.



Bibliografía

8. Bibliografía

1. Meredith, M.J. and D.J. Reed, *Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3747-53.
2. Hwang, C., A.J. Sinskey, and H.F. Lodish, *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum*. Science, 1992. **257**(5076): p. 1496-502.
3. Garcia-Gimenez, J.L., et al., *Nuclear glutathione*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(5): p. 3304-16.
4. Del Rio, L.A., *Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules*. Arch Biochem Biophys, 2011. **506**(1): p. 1-11.
5. Pastore, A. and F. Piemonte, *S-Glutathionylation signaling in cell biology: progress and prospects*. Eur J Pharm Sci, 2012. **46**(5): p. 279-92.
6. Lu, S.C., *Glutathione synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(5): p. 3143-53.
7. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 711-60.
8. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification*. J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17205-8.
9. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
10. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell Signal, 2012. **24**(5): p. 981-90.
11. Fernandez-Checa, J.C., et al., *GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. G7-17.
12. Garcia-Ruiz, C. and J.C. Fernandez-Checa, *Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21 Suppl 3**: p. S3-6.
13. Huang, C.S., M.E. Anderson, and A. Meister, *Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20578-83.

14. Gipp, J.J., C. Chang, and R.T. Mulcahy, *Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(1): p. 29-35.
15. Yan, N. and A. Meister, *Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase*. J Biol Chem, 1990. **265**(3): p. 1588-93.
16. Seelig, G.F., R.P. Simonsen, and A. Meister, *Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits*. J Biol Chem, 1984. **259**(15): p. 9345-7.
17. Huang, C.S., et al., *Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19675-80.
18. Yang, Y., et al., *Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49446-52.
19. Krejsa, C.M., et al., *Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 16116-24.
20. Richman, P.G. and A. Meister, *Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione*. J Biol Chem, 1975. **250**(4): p. 1422-6.
21. Huang, Z.Z., et al., *Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration*. FASEB J, 2001. **15**(1): p. 19-21.
22. Yang, H., et al., *Effects of hepatocyte growth factor on glutathione synthesis, growth, and apoptosis is cell density-dependent*. Exp Cell Res, 2008. **314**(2): p. 398-412.
23. Yang, H., et al., *Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 2): p. 399-408.
24. Kim, S.K., et al., *Insulin signaling regulates gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression in primary cultured rat hepatocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(1): p. 99-108.
25. Lu, S.C. and J.L. Ge, *Loss of suppression of GSH synthesis at low cell density in primary cultures of rat hepatocytes*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 1): p. C1181-9.
26. Jardine, H., et al., *Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21158-66.

27. Arsalane, K., et al., *Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549: transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(5): p. 599-607.
28. Franklin, C.C., et al., *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 86-98.
29. Yang, H., et al., *Induction of avian musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins by toxic bile acid inhibits expression of glutathione synthetic enzymes and contributes to cholestatic liver injury in mice*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1291-301.
30. Mulcahy, R.T., H.H. Bailey, and J.J. Gipp, *Up-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels*. Cancer Chemother Pharmacol, 1994. **34**(1): p. 67-71.
31. Mulcahy, R.T., et al., *Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7445-54.
32. Mulcahy, R.T. and J.J. Gipp, *Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(1): p. 227-33.
33. Moinova, H.R. and R.T. Mulcahy, *An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14683-9.
34. Hudson, F.N. and T.J. Kavanagh, *Cloning and characterization of the proximal promoter region of the mouse glutamate-L-cysteine ligase regulatory subunit gene*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1492**(2-3): p. 447-51.
35. Yang, H., et al., *Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 447-55.
36. Rahman, I., et al., *Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells*. FEBS Lett, 1996. **396**(1): p. 21-5.

37. Sekhar, K.R., et al., *Alteration of transcriptional and post-transcriptional expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by diethyl maleate*. Radiat Res, 1997. **147**(5): p. 592-7.
38. Thompson, J.A., et al., *Distinct Nrf1/2-independent mechanisms mediate As 3+-induced glutamate-cysteine ligase subunit gene expression in murine hepatocytes*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(12): p. 1614-25.
39. Turpaev, K.T., *Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles*. Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(2): p. 111-26.
40. Orłowski, M. and A. Meister, *Partial reactions catalyzed by -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate*. J Biol Chem, 1971. **246**(23): p. 7095-105.
41. Griffith, O.W., M.E. Anderson, and A. Meister, *Inhibition of glutathione biosynthesis by prothionine sulfoximine (S-n-propyl homocysteine sulfoximine), a selective inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase*. J Biol Chem, 1979. **254**(4): p. 1205-10.
42. Sekhar, K.R. and M.L. Freeman, *Autophosphorylation inhibits the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase*. J Enzyme Inhib, 1999. **14**(4): p. 323-30.
43. Lu, S.C., et al., *Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat*. J Clin Invest, 1991. **88**(1): p. 260-9.
44. Sun, W.M., Z.Z. Huang, and S.C. Lu, *Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation*. Biochem J, 1996. **320** (Pt 1): p. 321-8.
45. Toroser, D., et al., *Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(2): p. 233-44.
46. Coppola, S. and L. Ghibelli, *GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(2): p. 56-61.
47. Franklin, C.C., et al., *Caspase-3-Dependent Cleavage of the Glutamate-L-Cysteine Ligase Catalytic Subunit during Apoptotic Cell Death*. Am J Pathol, 2002. **160**(5): p. 1887-94.
48. Franco, R. and J.A. Cidlowski, *SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29542-57.
49. Wild, A.C., H.R. Moinova, and R.T. Mulcahy, *Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33627-36.

50. Benassi, B., et al., *c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 509-19.
51. Moinova, H.R. and R.T. Mulcahy, *Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(3): p. 661-8.
52. Fu, Y., et al., *Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1465-73.
53. Lu, S.C., et al., *Effect of thioacetamide on the hepatic expression of gamma-glutamylcysteine synthetase subunits in the Rat*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **159**(3): p. 161-8.
54. Yang, H., et al., *Dysregulation of glutathione synthesis during cholestasis in mice: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1982-91.
55. McKone, E.F., et al., *Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(4): p. 415-9.
56. Nakamura, S., et al., *Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction*. Circulation, 2002. **105**(25): p. 2968-73.
57. Nakamura, S., et al., *Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1425-7.
58. Nichenametla, S.N., et al., *Functional significance of the GAG trinucleotide-repeat polymorphism in the gene for the catalytic subunit of gamma-glutamylcysteine ligase*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 645-50.
59. Forman, H.J., K.J. Davies, and F. Ursini, *How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 24-35.
60. Fourquet, S., et al., *Activation of NRF2 by nitrosative agents and H2O2 involves KEAP1 disulfide formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8463-71.
61. Zhang, D.D., *The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(11): p. 1623-6.
62. Shelton, M.D. and J.J. Mieyal, *Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases*. Mol Cells, 2008. **25**(3): p. 332-46.

63. Humphries, K.M., J.K. Pennypacker, and S.S. Taylor, *Redox regulation of cAMP-dependent protein kinase signaling: kinase versus phosphatase inactivation*. J Biol Chem, 2007. **282**(30): p. 22072-9.
64. Mekhfi, H., et al., *Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils*. Circ Res, 1996. **78**(6): p. 1016-27.
65. Anselmo, A.N. and M.H. Cobb, *Protein kinase function and glutathionylation*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 3): p. e1-2.
66. Salsman, S.J., K. Hensley, and R.A. Floyd, *Sensitivity of protein tyrosine phosphatase activity to the redox environment, cytochrome C, and microperoxidase*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(7-8): p. 1078-88.
67. Rahman, I., et al., *Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(1-2): p. 42-59.
68. Aracena, P., et al., *Effects of S-glutathionylation and S-nitrosylation on calmodulin binding to triads and FKBP12 binding to type 1 calcium release channels*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(7-8): p. 870-81.
69. Chen, C.A., et al., *S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1115-8.
70. Taylor, E.R., et al., *Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19603-10.
71. McLain, A.L., P.A. Szweda, and L.I. Szweda, *alpha-Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor*. Free Radic Res, 2011. **45**(1): p. 29-36.
72. Demasi, M. and K.J. Davies, *Proteasome inhibitors induce intracellular protein aggregation and cell death by an oxygen-dependent mechanism*. FEBS Lett, 2003. **542**(1-3): p. 89-94.
73. Lind, C., et al., *Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis*. Arch Biochem Biophys, 2002. **406**(2): p. 229-40.
74. Dalton, T.P., et al., *Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(10): p. 1511-26.
75. Chen, Y., et al., *Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models*. Food Chem Toxicol, 2013. **60**: p. 38-44.
76. Dalton, T.P., et al., *Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 324-9.

77. Cole, T.B., et al., *Behavioral Characterization of GCLM-Knockout Mice, a Model for Enhanced Susceptibility to Oxidative Stress*. J Toxicol, 2011. **2011**: p. 157687.
78. Shi, Z.Z., et al., *Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5101-6.
79. Chen, Y., et al., *Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure*. Hepatology, 2007. **45**(5): p. 1118-28.
80. Kendig, E.L., et al., *Lipid metabolism and body composition in Gclm(-/-) mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2011. **257**(3): p. 338-48.
81. Weldy, C.S., et al., *Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene Gclm modulate vascular reactivity in mice*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(6): p. 1264-78.
82. Kaspar, J.W., S.K. Niture, and A.K. Jaiswal, *Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(9): p. 1304-9.
83. Niture, S.K. and A.K. Jaiswal, *Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44542-56.
84. Kobayashi, M. and M. Yamamoto, *Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species*. Adv Enzyme Regul, 2006. **46**: p. 113-40.
85. Zhang, D.D., *Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway*. Drug Metab Rev, 2006. **38**(4): p. 769-89.
86. Hayes, J.D. and M. McMahon, *NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(4): p. 176-88.
87. Kwak, M.K., et al., *Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(5): p. 809-17.
88. Wakabayashi, N., et al., *When NRF2 talks, who's listening?* Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(11): p. 1649-63.
89. Sykiotis, G.P., et al., *The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(1): p. 41-8.
90. Plafker, K.S., et al., *The ubiquitin-conjugating enzyme UbcM2 can regulate the stability and activity of the antioxidant transcription factor Nrf2*. J Biol Chem, 2010. **285**(30): p. 23064-74.

91. Niture, S.K., R. Khatri, and A.K. Jaiswal, *Regulation of Nrf2-an update*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 36-44.
92. Keum, Y.S. and B.Y. Choi, *Molecular and chemical regulation of the keap1-nrf2 signaling pathway*. Molecules, 2014. **19**(7): p. 10074-89.
93. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
94. Miseta, A. and P. Csutora, *Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms*. Mol Biol Evol, 2000. **17**(8): p. 1232-9.
95. Bryan, H.K., et al., *The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(6): p. 705-17.
96. Holland, R. and J.C. Fishbein, *Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(11): p. 1749-61.
97. Egger, A.L., et al., *Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10070-5.
98. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11908-13.
99. Fujii, S., et al., *The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response*. J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 23970-84.
100. Um, H.C., et al., *Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 161-8.
101. Holland, R., et al., *Prospective type 1 and type 2 disulfides of Keap1 protein*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(10): p. 2051-60.
102. Miao, W., et al., *Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20340-8.
103. Rushmore, T.H. and A.N. Kong, *Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes*. Curr Drug Metab, 2002. **3**(5): p. 481-90.

104. Bassermann, F., R. Eichner, and M. Pagano, *The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 150-62.
105. Furukawa, M. and Y. Xiong, *BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(1): p. 162-71.
106. Salazar, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2*. J Biol Chem, 2006. **281**(21): p. 14841-51.
107. Rada, P., et al., *SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(6): p. 1121-33.
108. Jain, A.K. and A.K. Jaiswal, *Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 12132-42.
109. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
110. Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis, *Histone acetyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 81-120.
111. Sun, Z., Y.E. Chin, and D.D. Zhang, *Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(10): p. 2658-72.
112. Katoh, Y., et al., *Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription*. Genes Cells, 2001. **6**(10): p. 857-68.
113. Thannickal, V.J., K.D. Aldweib, and B.L. Fanburg, *Tyrosine phosphorylation regulates H₂O₂ production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor β 1*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23611-5.
114. Krieger-Brauer, H.I. and H. Kather, *The stimulus-sensitive H₂O₂-generating system present in human fat-cell plasma membranes is multireceptor-linked and under antagonistic control by hormones and cytokines*. Biochem J, 1995. **307** (Pt 2): p. 543-8.
115. Sattler, M., et al., *Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species*. Blood, 1999. **93**(9): p. 2928-35.
116. Lo, Y.Y. and T.F. Cruz, *Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11727-30.

117. Bae, Y.S., et al., *Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation.* J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 217-21.
118. May, J.M. and C. de Haen, *Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells.* J Biol Chem, 1979. **254**(7): p. 2214-20.
119. Zafari, A.M., et al., *Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy.* Hypertension, 1998. **32**(3): p. 488-95.
120. Ushio-Fukai, M., et al., *Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22699-704.
121. Holland, J.A., et al., *Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells.* Endothelium, 1998. **6**(2): p. 113-21.
122. Greene, E.L., V. Velarde, and A.A. Jaffa, *Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells.* Hypertension, 2000. **35**(4): p. 942-7.
123. Rhee, S.G., et al., *Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation.* Sci STKE, 2000. **2000**(53): p. pe1.
124. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis.* Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
125. Harrison, D., et al., *Role of oxidative stress in atherosclerosis.* Am J Cardiol, 2003. **91**(3A): p. 7A-11A.
126. Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response.* Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 333-44.
127. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S18-25.
128. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease.* Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
129. Burgoyne, J.R., et al., *Redox signaling in cardiac physiology and pathology.* Circ Res, 2012. **111**(8): p. 1091-106.
130. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
131. Cheng, G., et al., *Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5.* Gene, 2001. **269**(1-2): p. 131-40.

132. Verdegem, D., et al., *Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism*. Cancer Metab, 2014. **2**: p. 19.
133. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
134. Nemoto, S., et al., *Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7311-8.
135. Werner, E. and Z. Werb, *Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases*. J Cell Biol, 2002. **158**(2): p. 357-68.
136. Hancock, J.T., *The role of redox in signal transduction*. Methods Mol Biol, 2008. **476**: p. 1-9.
137. Zweier, J.L., et al., *Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues*. Nat Med, 1995. **1**(8): p. 804-9.
138. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
139. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(11): p. 1709-15.
140. Garthwaite, J., *Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system*. Trends Neurosci, 1991. **14**(2): p. 60-7.
141. Langrehr, J.M., et al., *Nitric oxide--a new endogenous immunomodulator*. Transplantation, 1993. **55**(6): p. 1205-12.
142. Li, H. and U. Forstermann, *Pharmacological prevention of eNOS uncoupling*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(22): p. 3595-606.
143. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
144. Stroes, E., et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 41-6.
145. Heitzer, T., et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus*. Diabetologia, 2000. **43**(11): p. 1435-8.
146. Higashi, Y., et al., *Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals*. Am J Hypertens, 2002. **15**(4 Pt 1): p. 326-32.
147. Jarasch, E.D., et al., *Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium*. Cell, 1981. **25**(1): p. 67-82.

148. Harrison, R., *Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(6): p. 774-97.
149. Granger, D.N., *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury.* Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1269-75.
150. Guzik, T.J., et al., *Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(2): p. 333-9.
151. Spiekermann, S., et al., *Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation.* Circulation, 2003. **107**(10): p. 1383-9.
152. Khazaei, M., F. Moien-Afshari, and I. Laher, *Vascular endothelial function in health and diseases.* Pathophysiology, 2008. **15**(1): p. 49-67.
153. Galley, H.F. and N.R. Webster, *Physiology of the endothelium.* Br J Anaesth, 2004. **93**(1): p. 105-13.
154. Sena, C.M., A.M. Pereira, and R. Seica, *Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(12): p. 2216-31.
155. Liu, R.M. and K.A. Gaston Pravia, *Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis.* Free Radic Biol Med, 2010. **48**(1): p. 1-15.
156. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease.* Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
157. Friedman, S.L., et al., *Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line.* Sci Transl Med, 2013. **5**(167): p. 167sr1.
158. Fiers, W., et al., *More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage.* Oncogene, 1999. **18**(54): p. 7719-30.
159. Lawson, W.E., et al., *Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(26): p. 10562-7.
160. Zeisberg, M., et al., *Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition.* J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23337-47.
161. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
162. Rowe, R.G., et al., *Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression.* Mol Cell Biol, 2011. **31**(12): p. 2392-403.

163. Munger, J.S., et al., *Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1376-82.
164. Duffield, J.S., et al., *Host responses in tissue repair and fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 241-76.
165. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 524-9.
166. Eddy, A.A., *Can renal fibrosis be reversed?* Pediatr Nephrol, 2005. **20**(10): p. 1369-75.
167. Eddy, A.A., *Molecular insights into renal interstitial fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(12): p. 2495-508.
168. Grande, M.T. and J.M. Lopez-Novoa, *Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy*. Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(6): p. 319-28.
169. Eddy, A.A., *Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. **4**(1): p. 2-8.
170. Sedeek, M., et al., *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(10): p. 1512-8.
171. Barnes, J.L. and Y. Gorin, *Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases*. Kidney Int, 2011. **79**(9): p. 944-56.
172. Ryoo, I.G., et al., *Involvement of Nrf2-GSH signaling in TGFbeta1-stimulated epithelial-to-mesenchymal transition changes in rat renal tubular cells*. Arch Pharm Res, 2014.
173. Chevalier, R.L., M.S. Forbes, and B.A. Thornhill, *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1145-52.
174. Eddy, A.A., et al., *Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(8): p. 1233-47.
175. Pellicoro, A., et al., *Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 181-94.
176. Lee, U.E. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 195-206.
177. Kong, D., et al., *Clearance of activated stellate cells for hepatic fibrosis regression: molecular basis and translational potential*. Biomed Pharmacother, 2013. **67**(3): p. 246-50.

178. Tsukada, H., et al., *Acidic fibroblast growth factor promotes hepatic differentiation of monkey embryonic stem cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. **42**(3-4): p. 83-8.
179. Baroni, G.S., et al., *Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis*. Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1189-99.
180. Yang, J.J., et al., *Nuclear erythroid 2-related factor 2: a novel potential therapeutic target for liver fibrosis*. Food Chem Toxicol, 2013. **59**: p. 421-7.
181. Tanaka, Y., et al., *ANIT-induced intrahepatic cholestasis alters hepatobiliary transporter expression via Nrf2-dependent and independent signaling*. Toxicol Sci, 2009. **108**(2): p. 247-57.
182. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. RNA, 2003. **9**(3): p. 277-9.
183. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
184. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
185. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
186. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
187. Griffiths-Jones, S., et al., *MicroRNA evolution by arm switching*. EMBO Rep, 2011. **12**(2): p. 172-7.
188. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
189. Zimmerman, A.L. and S. Wu, *MicroRNAs, cancer and cancer stem cells*. Cancer Lett, 2011. **300**(1): p. 10-9.
190. Winter, J. and S. Diederichs, *MicroRNA biogenesis and cancer*. Methods Mol Biol, 2011. **676**: p. 3-22.
191. Czech, B. and G.J. Hannon, *Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(1): p. 19-31.
192. Kim, W., et al., *Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in Arabidopsis*. Cell Res, 2009. **19**(7): p. 899-909.

193. Ying, S.Y. and S.L. Lin, *Intron-derived microRNAs--fine tuning of gene functions*. Gene, 2004. **342**(1): p. 25-8.
194. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
195. Slezak-Prochazka, I., et al., *MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing*. RNA, 2010. **16**(6): p. 1087-95.
196. Breving, K. and A. Esquela-Kerscher, *The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(8): p. 1316-29.
197. Lipovich, L., R. Johnson, and C.Y. Lin, *MacroRNA underdogs in a microRNA world: evolutionary, regulatory, and biomedical significance of mammalian long non-protein-coding RNA*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(9): p. 597-615.
198. Qureshi, I.A. and M.F. Mehler, *The emerging role of epigenetics in stroke: II. RNA regulatory circuitry*. Arch Neurol, 2010. **67**(12): p. 1435-41.
199. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
200. Ohler, U., et al., *Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification*. RNA, 2004. **10**(9): p. 1309-22.
201. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
202. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
203. Conrad, C. and R. Rauhut, *Ribonuclease III: new sense from nuisance*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(2): p. 116-29.
204. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9779-84.
205. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
206. Basyuk, E., et al., *Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(22): p. 6593-7.
207. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.

208. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
209. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
210. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
211. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
212. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
213. Brownawell, A.M. and I.G. Macara, *Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins*. J Cell Biol, 2002. **156**(1): p. 53-64.
214. Gwizdek, C., et al., *Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5505-8.
215. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
216. Gwizdek, C., et al., *Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcripts to the cell cytoplasm. Terminal minihelix and RNA export*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25910-8.
217. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
218. Bernstein, E., A.M. Denli, and G.J. Hannon, *The rest is silence*. RNA, 2001. **7**(11): p. 1509-21.
219. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing*. Cell, 2001. **106**(1): p. 23-34.
220. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
221. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
222. Lim, L.P., et al., *Vertebrate microRNA genes*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1540.
223. Aravin, A.A., et al., *The small RNA profile during Drosophila melanogaster development*. Dev Cell, 2003. **5**(2): p. 337-50.

-
224. Lagos-Quintana, M., et al., *New microRNAs from mouse and human*. RNA, 2003. **9**(2): p. 175-9.
225. Okamura, K., et al., *The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(4): p. 354-63.
226. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
227. Yang, S.W. and T. Vosch, *Rapid detection of microRNA by a silver nanocluster DNA probe*. Anal Chem, 2011. **83**(18): p. 6935-9.
228. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(20): p. e179.
229. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
230. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
231. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-74.
232. Schwarz, D.S., et al., *Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 537-48.
233. Kalmykova, A.I., M.S. Klenov, and V.A. Gvozdev, *Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the Drosophila male germline*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(6): p. 2052-9.
234. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 185-97.
235. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
236. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
237. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
238. Zamore, P.D., *Ancient pathways programmed by small RNAs*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1265-9.
239. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.

240. Wakiyama, M., et al., *Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1857-62.
241. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
242. Nelson, P.T., A.G. Hatzigeorgiou, and Z. Mourelatos, *miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line*. RNA, 2004. **10**(3): p. 387-94.
243. Lytle, J.R., T.A. Yario, and J.A. Steitz, *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9667-72.
244. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
245. Baek, D., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 64-71.
246. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
247. Ritchie, W. and J.E. Rasko, *Refining microRNA target predictions: sorting the wheat from the chaff*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **445**(4): p. 780-4.
248. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
249. Meijer, H.A., E.M. Smith, and M. Bushell, *Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?* Biochem Soc Trans, 2014. **42**(4): p. 1135-40.
250. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
251. Nielsen, C.B., et al., *Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs*. RNA, 2007. **13**(11): p. 1894-910.
252. Kloosterman, W.P., et al., *Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(21): p. 6284-91.
253. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1608-13.
254. Huang, V., et al., *Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(4): p. 1695-707.

-
255. Huang, V. and L.C. Li, *miRNA goes nuclear*. RNA Biol, 2012. **9**(3): p. 269-73.
256. Luense, L.J., M.Z. Carletti, and L.K. Christenson, *Role of Dicer in female fertility*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(6): p. 265-72.
257. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 721-6.
258. Sayed, D., et al., *MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3272-82.
259. Xiao, J., et al., *Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4*. J Cell Physiol, 2007. **212**(2): p. 285-92.
260. Lu, Y., et al., *A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(3): p. e24.
261. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
262. Stachurska, A., et al., *Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(3): p. 504-15.
263. Narasimhan, M., et al., *Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51111.
264. Papp, D., et al., *The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops*. FEBS Lett, 2012. **586**(13): p. 1795-802.
265. Im, Y.B., et al., *miR23b ameliorates neuropathic pain in spinal cord by silencing NADPH oxidase 4*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(10): p. 1046-60.
266. Fu, Y., et al., *Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miRNA-25-mediated NOX4 expression in experimental diabetic nephropathy*. Am J Nephrol, 2010. **32**(6): p. 581-9.
267. Shilo, S., et al., *Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 471-7.
268. Cheng, X., C.H. Ku, and R.C. Siow, *Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis*. Free Radic Biol Med, 2013. **64**: p. 4-11.

269. Ungvari, Z., et al., *Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(8): p. 877-91.
270. Wiesen, J.L. and T.B. Tomasi, *Dicer is regulated by cellular stresses and interferons*. Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1222-8.
271. Martello, G., et al., *A MicroRNA targeting dicer for metastasis control*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1195-207.
272. Crampton, N., et al., *Oxidative stress inhibits nuclear protein export by multiple mechanisms that target FG nucleoporins and Crm1*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(24): p. 5106-16.
273. Sato, F., et al., *MicroRNAs and epigenetics*. FEBS J, 2011. **278**(10): p. 1598-609.
274. Cyr, A.R. and F.E. Domann, *The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(2): p. 551-89.
275. Poulsen, H.E., et al., *RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism?* Free Radic Biol Med, 2012. **52**(8): p. 1353-61.
276. Sangokoya, C., M.J. Telen, and J.T. Chi, *microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4338-48.
277. Li, N., et al., *Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1*. Mech Ageing Dev, 2011. **132**(3): p. 75-85.
278. Yang, M., et al., *MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(3): p. 983-91.
279. Eades, G., et al., *miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 40725-33.
280. Hou, W., et al., *MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins*. Hepatology, 2010. **51**(5): p. 1494-504.
281. Chan, S.Y., et al., *MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2*. Cell Metab, 2009. **10**(4): p. 273-84.
282. Santoro, M.M. and S. Nicoli, *miRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs*. Exp Cell Res, 2013. **319**(9): p. 1324-30.

-
283. Fish, J.E., et al., *miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 272-84.
284. Wang, S., et al., *The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 261-71.
285. Kuhnert, F. and C.J. Kuo, *miR-17-92 angiogenesis micromanagement*. Blood, 2010. **115**(23): p. 4631-3.
286. Treguer, K., et al., *Role of the microRNA-17-92 cluster in the endothelial differentiation of stem cells*. J Vasc Res, 2012. **49**(5): p. 447-60.
287. Zhou, Q., et al., *Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(20): p. 8287-92.
288. Urbich, C., et al., *MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1607-16.
289. Fiedler, J., et al., *MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction*. Circulation, 2011. **124**(6): p. 720-30.
290. Dentelli, P., et al., *microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(8): p. 1562-8.
291. Nicoli, S., et al., *miR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development*. Dev Cell, 2012. **22**(2): p. 418-29.
292. Pottier, N., et al., *FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(3): p. 119-26.
293. Karakikes, I., et al., *Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(2): p. e000078.
294. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.
295. Chau, B.N., et al., *MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways*. Sci Transl Med, 2012. **4**(121): p. 121ra18.
296. Liu, G., et al., *miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1589-97.
297. van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13027-32.

298. Luk, J.M., et al., *DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30706-13.
299. Benetatos, L., et al., *The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(5): p. 795-814.
300. Benetatos, L., E. Voulgaris, and G. Vartholomatos, *DLK1-MEG3 imprinted domain microRNAs in cancer biology*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2012. **22**(1): p. 1-15.
301. Snyder, C.M., et al., *MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration*. Development, 2013. **140**(1): p. 31-42.
302. Song, G. and L. Wang, *A conserved gene structure and expression regulation of miR-433 and miR-127 in mammals*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7829.
303. Song, G. and L. Wang, *MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3574.
304. Song, G. and L. Wang, *Transcriptional mechanism for the paired miR-433 and miR-127 genes by nuclear receptors SHP and ERRgamma*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(18): p. 5727-35.
305. Li, R., et al., *The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF-beta/Smad3-Azin1 pathway*. Kidney Int, 2013. **84**(6): p. 1129-44.
306. Ueda, T., et al., *Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis*. Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 136-46.
307. Shih, K.K., et al., *A microRNA survival signature (MiSS) for advanced ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(3): p. 444-50.
308. Guled, M., et al., *CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(7): p. 615-23.
309. Dai, Y., et al., *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients*. Rheumatol Int, 2009. **29**(7): p. 749-54.
310. Lehmann, U., *MicroRNA-profiling in formalin-fixed paraffin-embedded specimens*. Methods Mol Biol, 2010. **667**: p. 113-25.
311. Luo, H., et al., *Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**: p. 82.

-
312. Wang, Q., et al., *MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy*. FASEB J, 2008. **22**(12): p. 4126-35.
313. Qi, Y., et al., *High-throughput sequencing of microRNAs in adenovirus type 3 infected human laryngeal epithelial cells*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 915980.
314. Simon, D., et al., *A mutation in the 3'-UTR of the HDAC6 gene abolishing the post-transcriptional regulation mediated by hsa-miR-433 is linked to a new form of dominant X-linked chondrodysplasia*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(10): p. 2015-27.
315. Estep, M., et al., *Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(3): p. 487-97.
316. Wang, G., et al., *Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 283-9.
317. Laloo, B., et al., *Analysis of post-transcriptional regulation using the FunREG method*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(6): p. 1608-14.
318. Castelli, E.C., et al., *In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes*. Hum Immunol, 2009. **70**(12): p. 1020-5.
319. Riester, A., et al., *ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland*. Endocrinology, 2012. **153**(1): p. 212-22.
320. Lemaitre, H., et al., *Genetic variation in FGF20 modulates hippocampal biology*. J Neurosci, 2010. **30**(17): p. 5992-7.
321. Wang, W., et al., *MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2012. **33**(5): p. 1113-20.
322. Schmitt, I., et al., *Variants in the 3'UTR of SNCA do not affect miRNA-433 binding and alpha-synuclein expression*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(12): p. 1265-9.
323. de Mena, L., et al., *FGF20 rs12720208 SNP and microRNA-433 variation: no association with Parkinson's disease in Spanish patients*. Neurosci Lett, 2010. **479**(1): p. 22-5.
324. Ahn, H.W., et al., *MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(7): p. 463-71.

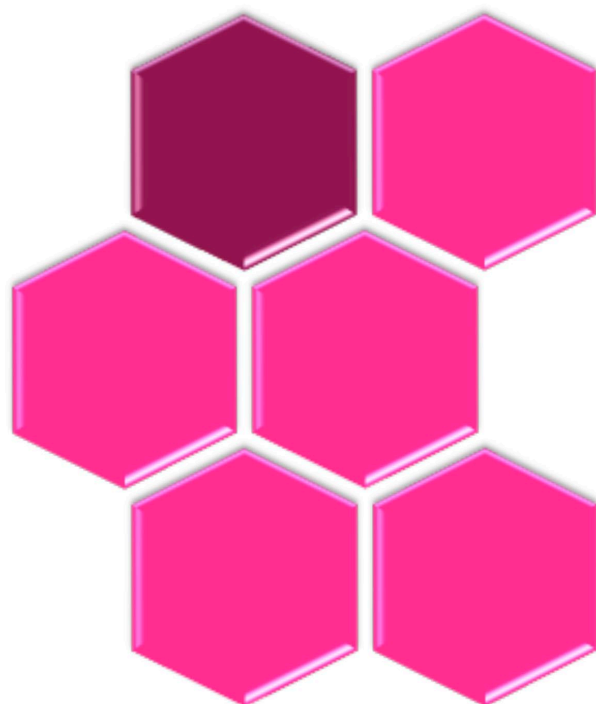
325. Chiang, H.R., et al., *Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes*. Genes Dev, 2010. **24**(10): p. 992-1009.
326. Botta, D., et al., *Glutamate-cysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(5): p. 632-42.
327. Gutscher, M., et al., *Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential*. Nat Methods, 2008. **5**(6): p. 553-9.
328. Meyer, A.J. and T.P. Dick, *Fluorescent protein-based redox probes*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(5): p. 621-50.
329. Burnette, W.N., *Western blotting*. Clin Chem, 2011. **57**(1): p. 132-3.
330. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
331. Esteban, V., et al., *Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(6): p. 1514-29.
332. Mulvany, M.J. and W. Halpern, *Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats*. Circ Res, 1977. **41**(1): p. 19-26.
333. Rodriguez-Manas, L., et al., *Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature*. Diabetologia, 2003. **46**(4): p. 556-66.
334. Hayes, J.D. and A.T. Dinkova-Kostova, *The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(4): p. 199-218.
335. Akiyoshi, S., et al., *Clinical significance of miR-144-ZFX axis in disseminated tumour cells in bone marrow in gastric cancer cases*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1345-53.
336. Sanchez-Gomez, F.J., et al., *S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker*. Biol Chem, 2013. **394**(10): p. 1263-80.
337. Huang, K.P. and F.L. Huang, *Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 1049-56.
338. Laursen, J.B., et al., *Endothelium-dependent vasorelaxation is inhibited by in vivo depletion of vascular thiol levels: role of endothelial nitric oxide synthase*. Free Radic Res, 2001. **35**(4): p. 387-94.

339. Ramani, K., et al., *Mechanism and significance of changes in glutamate-cysteine ligase expression during hepatic fibrogenesis*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 36341-55.
340. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 464-78.
341. Chung, A.S. and N. Ferrara, *Developmental and pathological angiogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 563-84.
342. Ucero, A.C., et al., *Obstructive renal injury: from fluid mechanics to molecular cell biology*. Open Access J Urol, 2010. **2**: p. 41-55.
343. Ucero, A.C., et al., *Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction*. Int Urol Nephrol, 2014. **46**(4): p. 765-76.
344. Parikh, C.R. and P. Devarajan, *New biomarkers of acute kidney injury*. Crit Care Med, 2008. **36**(4 Suppl): p. S159-65.
345. Humphreys, B.D., et al., *Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 4023-35.
346. Devarajan, P., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2008. **241**: p. 89-94.
347. Weldy, C.S., et al., *Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene Gclm modulate plasma redox and vascular responses to acute diesel exhaust inhalation in mice*. Inhal Toxicol, 2013. **25**(8): p. 444-54.
348. Miles, G.D., et al., *Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian cancer*. BMC Res Notes, 2012. **5**: p. 164.
349. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
350. Do, M.T., et al., *Metformin suppresses CYP1A1 and CYP1B1 expression in breast cancer cells by down-regulating aryl hydrocarbon receptor expression*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **280**(1): p. 138-148.
351. Narasimhan, M., et al., *Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity*. Toxicol Lett, 2014. **228**(3): p. 179-91.
352. Pulkkinen, K.H., S. Yla-Herttuala, and A.L. Levonen, *Heme oxygenase 1 is induced by miR-155 via reduced BACH1 translation in endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(11): p. 2124-31.

353. Li, S., et al., *microRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells*. Mol Med Rep, 2012. **5**(4): p. 949-54.
354. Chapple, S.J., R.C. Siow, and G.E. Mann, *Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1315-20.
355. Crabtree, M.J., et al., *Integrated redox sensor and effector functions for tetrahydrobiopterin- and glutathionylation-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling*. J Biol Chem, 2013. **288**(1): p. 561-9.
356. Chen, C.S., et al., *Nrf2-Keap1 antioxidant defense and cell survival signaling are upregulated by 17beta-estradiol in homocysteine-treated dopaminergic SH-SY5Y cells*. Neuroendocrinology, 2013. **97**(3): p. 232-41.
357. Hoang, Y.D., B.N. Nakamura, and U. Luderer, *Follicle-stimulating hormone and estradiol interact to stimulate glutathione synthesis in rat ovarian follicles and granulosa cells*. Biol Reprod, 2009. **81**(4): p. 636-46.
358. Breton-Romero, R. and S. Lamas, *Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 529-534.
359. Crabtree, M.J., et al., *Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(4): p. H1530-40.
360. Stroes, E., et al., *Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase*. FEBS Lett, 1998. **438**(3): p. 161-4.
361. Ignarro, L.J., *Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview*. J Physiol Pharmacol, 2002. **53**(4 Pt 1): p. 503-14.
362. Thannickal, V.J., *Mechanisms of pulmonary fibrosis: role of activated myofibroblasts and NADPH oxidase*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapiesPetro E Petrides and David Brenner): p. S23.
363. Hecker, L., et al., *NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1077-81.
364. Yoon, Y.S., et al., *TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells*. Oncogene, 2005. **24**(11): p. 1895-903.
365. Mishra, S., S.R. Ande, and B.L. Nyomba, *The role of prohibitin in cell signaling*. FEBS J, 2010. **277**(19): p. 3937-46.

366. Yang, H., et al., *Activation of a Novel c-Myc-miR27-Prohibitin 1 Circuitry in Cholestatic Liver Injury Inhibits Glutathione Synthesis in Mice*. *Antioxid Redox Signal*, 2014.

Anexo



FORUM ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase
by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis
and Promotes TGF- β -Dependent Fibrogenesis

Cristina Espinosa-Diez,¹ Marta Fierro-Fernández,¹ Francisco Sánchez-Gómez,¹
Fernando Rodríguez-Pascual,¹ Matilde Alique,² Marta Ruiz-Ortega,² Naiara Beraza,³
Maria L. Martinez Chantar,³ Carlos Fernandez-Hernando,⁴ and Santiago Lamas¹

Abstract

Aims: Glutathione (GSH) is the main antioxidant against cell damage. Several pathological states course with reduced nucleophilic tone and perturbation of redox homeostasis due to changes in the 2GSH/GSSG ratio. Here, we investigated the regulation of the rate-limiting GSH biosynthetic heterodimeric enzyme γ -glutamyl-cysteine ligase (GCL) by microRNAs (miRNAs). **Results:** “In silico” analysis of the 3′- untranslated regions (UTRs) of both catalytic (GCLc) and regulatory (GCLm) subunits of GCL enabled an identification of miR-433 as a strong candidate for the targeting of GCL. Transitory overexpression of miR-433 in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) showed a downregulation of both GCLc and GCLm in a nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)-independent manner. Increases in pro-oxidant stimuli such as exposure to hydrogen peroxide or GSH depletion in endothelial and hepatic cells caused an expected increase in GCLc and GCLm protein expression and abrogation of miR-433 levels, thus supporting a cross-regulation of these pathways. Treatment of HUVEC with miR-433 resulted in reduced antioxidant and redox potentials, increased S-glutathionylation, and reduced endothelial nitric oxide synthase activation. *In vivo* models of renal and hepatic fibrosis were associated with transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-related reduction of GCLc and GCLm levels that were miR-433 dependent. **Innovation and Conclusion:** We describe for the first time an miRNA, miR-433, capable of directly targeting GCL and promoting functional consequences in endothelial physiology and fibrotic processes by decreasing GSH levels. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

Introduction

GLUTATHIONE (GSH) is considered the quintessential endogenous antioxidant largely due to its relatively high intracellular concentrations (0.5–10 mM) (40). While ubiquitous, it is preferentially synthesized in the liver as a tripeptide (γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) and it pairs with the disulfide form (GSSG) in a relatively constant molar ratio (2GSH/GSSG) of 100–300:1 corresponding to redox poten-

tials from –220 to –240 mV (56), although this relationship has been recently challenged (42). GSH contributes to detoxify deleterious metabolites, regulating the cell cycle and, above all, maintaining redox homeostasis by preserving nucleophilic tone, redox potential and facilitating redox signaling [see Ref. (37) for review]. Synthesis of GSH takes place in a two-step reaction. In the first step, glutamate is conjugated with cysteine through the carboxyl group in the γ -position of the glutamate and the amino group of the cysteine,

¹Departamento de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

²Cellular Biology in Renal Diseases Laboratory, Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Spain.

³Department of Metabolomics, CIC bioGUNE, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Bizkaia, Spain.

⁴Vascular Biology and Therapeutics Program, Department of Comparative Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut.

Innovation

The regulation of glutathione biosynthesis is of critical importance for cellular redox homeostasis. γ -Glutamyl-cysteine ligase (GCL) is the enzyme in charge of the rate-limiting step in this process. So far, very little information is available on the post-transcriptional regulation of GCL. Here, we describe miR-433 as the first microRNA that directly targets both subunits of GCL, also resulting in reduced GSH biosynthesis, thus adding a new regulatory mode for GCL expression. Functionally, downregulation of GCL by miR-433 is relevant for endothelial homeostasis and hormetic responses involved in fibrogenesis, as observed in two different models of organ fibrosis.

while in the second one the γ -glutamyl-L-cysteine reacts with the glycine to form γ -glutamyl-cysteinyl-glycine. Both reactions require adenosine triphosphate (ATP). The enzymes involved in the synthesis are γ -glutamyl-cysteine ligase (GCL), also called γ -glutamyl-cysteine synthetase and GSH synthetase. GCL catalyzes the first and also limiting step in the synthesis of GSH. This enzyme is composed of two subunits (heavy, Mr 73,000; and light, Mr 31,000) with the heavy subunit (GCLc) accounting for both the catalytic activity of the isolated enzyme (28) and the feedback inhibition by GSH (59). The regulation of GCLc expression takes place at the transcriptional and post-transcriptional levels and has been discussed in detail elsewhere (15, 37). Hormones such as insulin (29), rapid liver growth, or antioxidants (38) are well-known inducers of GCLc transcription. On the other hand, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) is one of the major repressors of GCL expression and subsequent GSH depletion (27, 33, 34, 55). It has been proposed that these regulations are ruled mainly by the binding of transcription factors to antioxidant response element (ARE) boxes within the GCLc promoter (27, 36, 53, 71). Several transcription factors, including nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), the activator protein 1 (AP-1) family, and nuclear factor κ B (NF κ B), are involved in this interaction (54, 72). Nrf2, as the essential transcription factor binding to ARE (20), takes central stage in the regulation of GCL expression. The activity of GCLc is also regulated by phosphorylation at the post-translational level (37, 62). The light subunit (GCLm) does not exhibit catalytic activity by itself, but contributes to the function of the heavy subunit, critically affecting interactions of the substrate at the active site (22, 42). Oxidative stress can orchestrate the induction of both GCLc and GCLm and this induction, like that promoted by certain xenobiotics, is linked to the Nrf2-ARE pathway. However, other pro-oxidants such as ethanol and TGF- β 1 do not affect GCLm expression (17). Interestingly, hepatic toxicity induced by either lithocholic acid (72) or bile duct ligation (BDL) (45, 63) triggers a biphasic response in the expression of both subunits, causing an initial upregulation and further repression of the enzymes (72).

MicroRNAs (miRNAs) are short (20–24 nt) noncoding RNAs involved in post-transcriptional regulation of gene expression by affecting both stability and translation of mRNA. More than half of all mRNAs are estimated to be targets of miRNAs, and each miRNA is predicted to regulate approximately hundreds of targets [for review, see Refs. (5, 26)]. Consistent with this special capacity, miRNAs regulate

a broad range of biological processes, including cell proliferation, apoptosis, differentiation, and tissue repair (2, 4, 24, 31, 68, 70). There is now strong evidence that aberrant miRNA expression or function can lead to the development and progression of multiple human pathophysiological processes, including diabetes, cancer, and cardiovascular diseases (39, 58). There are still huge gaps in our understanding of redox homeostasis particularly with regard to its regulation *via* miRNAs, even though the term “redoximiR” has been recently coined. This set of miRNAs is mostly related to the regulation of the Nrf2 pathway, although increasing examples of specific targeting by miRNAs of cytosolic or mitochondrial genes are appearing [see Ref. (11) for review]. In the particular case of GCL subunits (here termed globally GCLs), there are very few reports about the potential involvement of miRNAs in their post-transcriptional regulation but with limited functional data (1). Hence, we sought to identify miRNAs that could directly target GCLs and interfere with their expression, in the belief that the final regulation of GSH balance could represent a major consequence of their action. We found that miR-433 targets both GCLc and GCLm and significantly affects their expression. Furthermore, we provide data supporting that this effect has a profound impact on redox-related pathophysiological processes such as endothelial dysfunction and organ fibrosis.

Results*Identification and confirmation of miR-433 as a candidate miRNA targeting GCLc and GCLm*

“*In silico*” analysis of the 3′-untranslated region (UTR) of GCLc and GCLm genes with the targetscan.org and mir-Walk.org databases provided a list of candidate miRNAs (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/ars) with complementary sequences in these regions. We selected miR-144 and miR-433 as the most interesting candidates. miR-144 has a predicted seed region in both 3′ UTRs, and it has been described as a redox-sensitive miRNA in sickle cell disease and in neurons by regulating Nrf2 (44, 57). In contrast, miR-433 has not been previously described as a redoximiR and it contains two highly conserved seed sequences in each GCL 3′-UTR. Thus, we focused on the analysis of miR-433.

The human GCLc 3′-UTR is 1414 bp long. The two seed target sites for miR-433 are situated in the extremes of the region (Fig. 1A). The first site is an 8-mer only present in *Homo sapiens*. The second site is a 7-mer conserved among several mammalian species (Fig. 1A). The human GCLm 3′-UTR is almost twice as long and also bears two targeting sites for miR-433 in its 3′-UTR (Fig. 1B). The first site is a poorly conserved 7-mer-1A seed sequence and the second site, which corresponds to the only functional site, is a 6-mer present in the human 3′-UTR. To verify the functional behavior of this targeting, the 3′-UTR's were cloned in a luciferase reporter vector. For GCLc, one intact and two mutated constructs, point mutation 1 (PM1) (C240G and A241U) and PM2 (including PM1 + C1204G and A1205U) were used. For GCLm, three different constructs named GCLmS1 (180–186), GCLmS2 (2417–2422), and GCLm S2 PM (C2419G and A2420U) were used. miR-433 was capable of decreasing luciferase activity by ~50% in the case of GCLc 3′-UTR (Fig. 2A) and 35% in the case of GCLm. This downregulation was partially absent in the

miR-433 TARGETS GCL AND INHIBITS GSH BIOSYNTHESIS

3

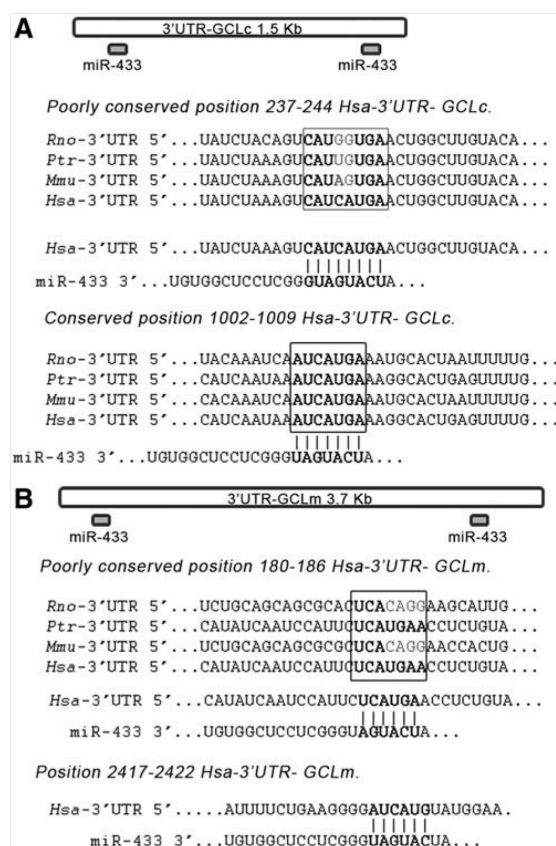


FIG. 1. Schematic of the 3'-UTRs from GCLc and GCLm mRNAs. (A) The GCLc 3'-UTR is 1414 kb long and contains two seed sites for miR-433 (depicted on top). The first seed site (poorly conserved) is only present in humans, and the second one is an 8-mer seed site conserved across several mammalian species. (B) The GCLm 3'-UTR is 3.7 kb long, and it also contains two target sites for miR-433 at the beginning and end of the sequence (indicated on top). The first one is poorly conserved across diverse species, and the second one is only present in humans. *Hsa*, *Homo Sapiens*; *Ptr*, *Pan troglodytes*; *Mmu*, *Mus musculus*; *Rno*, *Rattus norvegicus*; GCLc, glutamyl-cysteine ligase catalytic subunit; GCLm, glutamyl-cysteine ligase modifier subunit; UTR, untranslated region.

case of GCLc PM1 and completely abrogated for GCLc PM2. Mutation of the functional site in the GCLm seed sequence (GCLm S2 PM) resulted in only a 20% reduction in luciferase activity (Fig. 2B).

miR-433 decreases GCLs protein expression, GSH levels, and 2GSH/GSSG ratio while it promotes S-glutathionylation in endothelial cells

To evaluate the effect of miR-433 in endothelial cells, we transfected human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with the synthetic mature miRNA forms corresponding to a negative control (miR-NC), miR-433, or miR-144. miR-433 overexpression induced a significant downregulation of both

GCLc and GCLm protein levels, an effect that was not detectable with miR-144 transfection (Fig. 3A). Consistently, expression levels of GCLc and GCLm mRNAs were downregulated in miR-433 transfected cells (Fig. 3B). To test whether the downregulation of GCLs was also detectable in the presence of oxidative stimuli, we treated HUVEC with hydrogen peroxide (H_2O_2) for different periods of time in the presence and absence of exogenous miR-433. As shown in Figure 3C, exposure to miR-433 was associated with an inhibitory response in the expected upregulation of GCLc and GCLm.

To test the repercussion of GCLs downregulation induced by miR-433 on the final product of the biosynthetic pathway, we measured GSH levels in HUVEC, and evaluated the possible consequences of the formation of GSSG. As shown in Figure 4A, miR-433-treated cells showed a 50% reduction in GSH levels, with no significant effect on the oxidized form. In keeping with this result, the 2GSH/GSSG ratio, as determined with the fluorescent probe roGFP, markedly decreased (Fig. 4B). In addition, the redox potential determined according to the Nernst equation (41) was clearly affected (Fig. 4B, left panel). Decreased 2GSH/GSSG ratio is associated with potentially increased S-glutathionylation (48, 56). To verify this, HUVEC were labeled with biotinylated glutathione ethyl ester (BIOGEE) in the presence or absence of S-nitrosoglutathione (GSNO), an inducer of S-thiolation (23). Treatment with miR-433 resulted in a conspicuous increase in the number of S-glutathionylated proteins (Fig. 4B, right panel) and specific endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-S-glutathionylation (Supplementary Fig. S2A). This effect was observed both in basal conditions and after exposure to GSNO. Taken together, these results strongly support that miR-433 has profound consequences for GSH synthesis, altering the balance toward the formation of GSSG and mixed disulfides. We also evaluated whether the functional effects associated with miR-433-related GSH depletion could cause endothelial dysfunction. In HUVEC transfected with miR-433, we observed a significant reduction in eNOS activating phosphorylation in response to short treatments with H_2O_2 (Fig. 4C), which suggests that miR-433 has a deleterious effect on vascular function caused by GSH depletion (10, 30).

miR-433 induces nitroxidative stress

To analyze whether miR-433 also generated an increase in reactive oxygen species (ROS) production and therefore an imbalance in redox state, we measured ROS production with a probe for general ROS detection, 2',7'-dichlorofluorescein. As shown in Figure 5A, miR-433 increased cellular oxidative stress, in both the presence and absence of H_2O_2 .

To further confirm the pro-oxidative action of miR-433, we studied its potential effect on tyrosine nitration in human endothelial cells. In basal conditions, overexpression of miR-433 was associated with a visible increase in global protein nitration, which was enhanced with SIN-1 treatment (Fig. 5B). Taken together, these data support that miR-433 is able to promote an increase in nitroxidative stress by itself.

Opposite regulation of GCLs and miR-433 expression by pro-oxidative stimuli

To evaluate the effect of oxidative stress on the expression of GCLs and miR-433, we tested the effect of GSH depletion in HUVEC by using the chemical inhibitor of GSH synthesis,

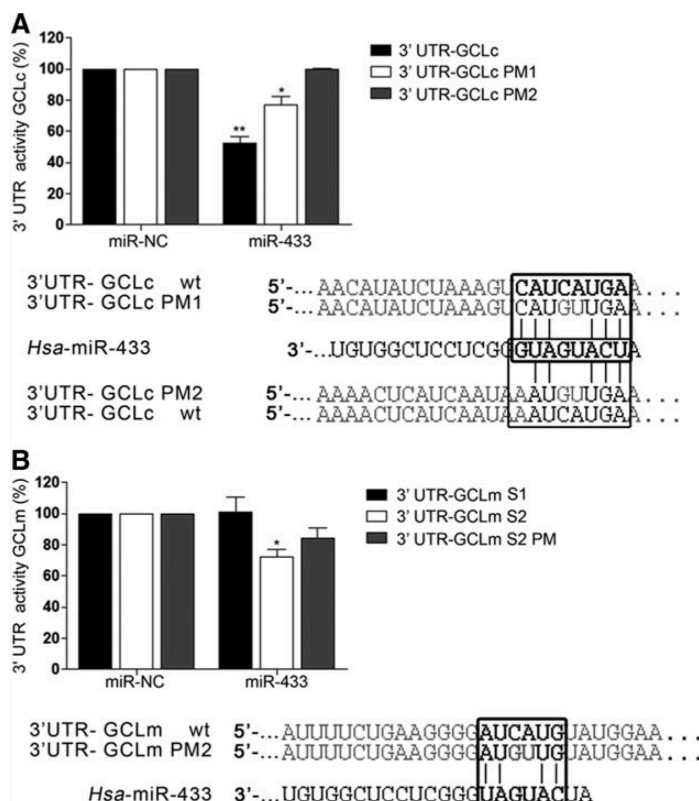


FIG. 2. miR-433 targets the 3'-UTRs of GCLc and GCLm. Luciferase reporter assays in the 3'-UTRs of GCLc and GCLm were carried out in COS-7 cells. COS-7 were transfected with their respective psiCHECK2-3'-UTR (125 ng) constructs and miR-433 (40 nM) or its mutated versions for 24 h. (A) The bar graph represents relative luciferase activity of GCLc 3'-UTR referred to as negative control (miR-NC). PM1 is a two-base change in the seed sequence (positions 237–344) for miR-433. PM2 is a mutant that contains both 3'-UTR seed sites for miR-433 mutated in the same bases (positions 237–244 and 1002–1004). (B) The bar graph represents relative luciferase activity of GCLm 3'-UTR referred to as negative control (miR-NC). GCLm site 1 (S1) is a 1 kb sequence that contains the first site for miR-433 (positions 180–186). The 3'-UTR-GCLm site 2 (S2) is a 1 kb construction that contains the second seed sequence (positions 2417–2422). 3'-UTR-GCLm PM2 (S2 PM) contains a two-base change in the S2 construction of GCLm. Data correspond to the mean \pm SEM of three experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ with regard to control. PM, point mutation.

L-buthionine-sulfoximine (L-BSO), that was effective in significantly depleting reduced GSH levels by 80% (data not shown) and, as expected, increased protein levels of GCLm significantly (Fig. 6A). The mRNA levels of GCLc experienced similar changes (Fig. 6B). This has been attributed to the regulatory feedback between the expression of GCLs and the final product of the reaction, GSH (15, 37). Of interest, L-BSO drastically reduced miR-433 levels (Fig. 6C), suggesting that depletion of GSH levels may also trigger responses directed toward the suppression of molecules inhibiting GCLs expression. Liver injury has also been related to redox damage and GSH depletion (53, 73). To explore the role of miR-433 in this context, we exposed HepG2, a hepatic cell line, to oxidative stress promoted by increasing concentrations of H_2O_2 . As shown in Supplementary Figure S3, H_2O_2 significantly induced the expression of GCLc and GCLm to 8 h with progressive decrease after this time point (Supplementary Fig. S3A). In concordance with these observations, H_2O_2 also significantly decreased miR-433 expression in a time-dependent fashion to 8 h (Supplementary Fig. S3B), consistently supporting an inverse regulation of GCLs and miR-433 by oxidative stimuli.

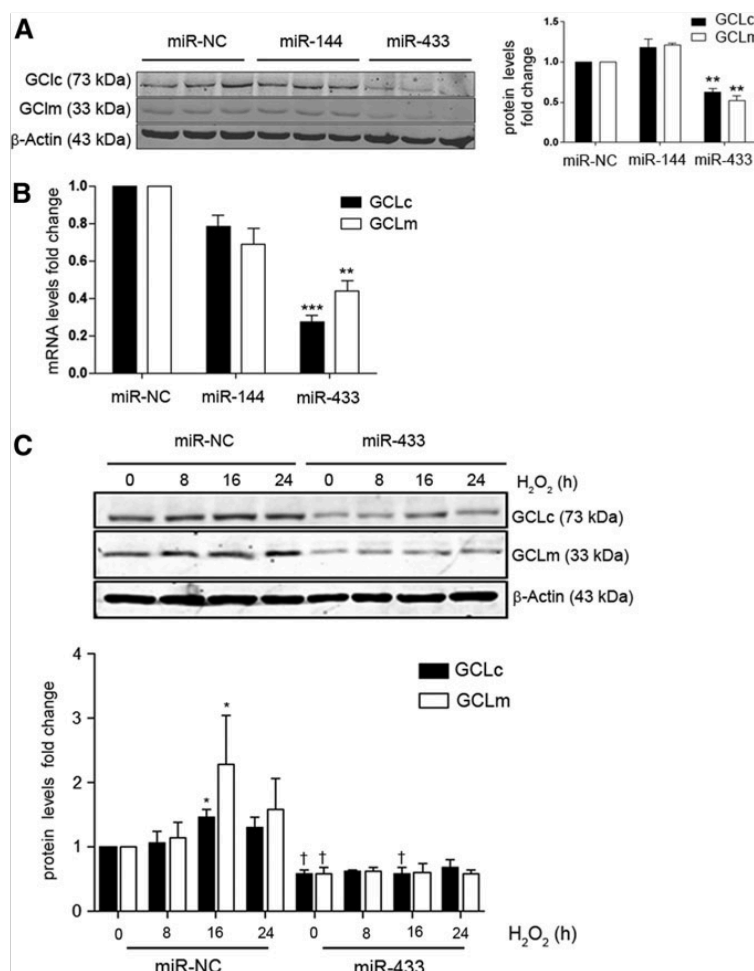
miR-433 decreases the expression of both GCLs by an Nrf2-independent mechanism

Nrf2 is a transcription factor that plays a fundamental role in antioxidant responses (20). Several miRNAs have been

shown to interfere with the Nrf2-Keap1-Bach-ARE pathways (7, 11, 20). Among them, miR-144 has been described to downregulate GCLs expression by an Nrf2-dependent mechanism in neuronal (44) and erythroid cells (57). Thus, we asked whether Nrf2 may also mediate the inhibitory effect of miR-433 on GCLs expression in endothelial cells. To confirm or refute whether the effect of miR-433 on GCLs levels was independent from Nrf2, we determined mRNA and protein levels of this transcription factor after overexpression with miR-433 in HUVEC and compared its potential effects with those of miR-144. As shown in Figure 7A, miR-433 had no effect on the protein or mRNA levels of Nrf2. miR-144 has been described to modify Nrf2 levels (44, 57). In our hands, we detected a tendency in this direction at both the mRNA and protein levels that did not reach statistical significance. These data suggest that the downregulation of GCLc and GCLm induced by miR-433 is independent from Nrf2. However, it is important to emphasize that Nrf2 remains a key element controlling the expression of GCLs, as its knockdown was associated with a clear decrement in the basal levels of both GCLs, more evident in the case of GCLm (Fig. 7B upper panels). In addition, Nrf2 appears to play a role in governing the expression of miR-433, as its absence results in reduced miRNA levels (Fig. 7B lower panel). This is also consistent with the observation that L-BSO treatment was able to abrogate the expression of miR-433 (Fig. 6C) as an absence of antioxidant pathways such as Nrf2 should also promote the

FIG. 3. miR-433 downregulates the expression of GCL subunits.

(A) HUVEC were transfected with 40 nM miRNA of either miR-433 or miR-144 and were lysed after 48 h. GCLc and GCLm protein levels (30 μ g) were analyzed by immunoblot. Shown is a representative blot and the quantitative densitometric analysis of $n=3$ experiments after correction by β -actin. (B) Bar graph represents mean \pm SEM of GCLc and GCLm mRNA levels determined by qPCR after 48 h of transfection with a negative control (miR-NC, 40 nM), miR-144 (40 nM), or miR-433 (40 nM), $n \geq 3$. (C) GCLs downregulation is maintained after exposure to H_2O_2 . HUVEC were kept in starvation without FBS for at least 6 h before treatment with 200 μ M H_2O_2 . The bar graph depicts a time course representing mean \pm SEM of $n \geq 3$ densitometric quantifications. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with regard to control; and $p < 0.05$ with regard to its corresponding control time point. FBS, fetal bovine serum; H_2O_2 , hydrogen peroxide; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; GCLs, GCL subunits; microRNA, miRNA; qPCR, quantitative polymerase chain reaction.



reduction of inhibitory molecules resulting in reduced GSH levels, such as miR-433.

miR-433 regulates redox responses associated to injury and fibrogenesis

In order to investigate the potential role of miR-433 in pathophysiological contexts, we addressed its function in two different models of injury. The first one consisted of inducing liver injury by BDL, a procedure which triggers cholestasis, liver dysfunction, and, eventually, fibrosis that courses with GSH depletion (53, 72). The drop in the levels of GCLc and GCLm was visible after 1 day and reflected in lesser quantified protein abundance and mRNA levels (GCLm) at 21 and 7–14 days after the surgical procedure, respectively (Fig. 8A, B). The levels of miR-433 were significantly increased at 14 and 21 days after BDL (Fig. 8C), thus supporting a relationship between the decrement of GCLs and upregulation of the miRNA. To evaluate the cellular responses that could underlie the effects described earlier, we employed the hepatic cell line Huh7 and exposed

it to TGF- β 1, the quintessential profibrotic cytokine. Treatment of Huh7 hepatoma cells with TGF- β 1 induced a reduction in the expression of GCLs and also diminished GSH levels at 48 h (Supplementary Fig. S4A, B). In addition, TGF- β 1 treatment at 48 h dramatically increased miR-433 levels (Supplementary Fig. S4C). Pretreatment with the inhibitory antagomir (antimiR-433) for miR-433 rescued TGF- β 1-induced inhibition of GCLs expression (Fig. 9A). As could be expected, TGF- β 1 was capable of inducing the expression of the fibrotic marker α SMA and interestingly, transfection with the antagomir prevented α -SMA TGF- β 1-dependent increase (Fig. 9B).

The second model, unilateral ureteral obstruction (UUO), results in obstructive uropathy of one kidney and abolition of its function due to renal fibrosis (65, 66). This fibrotic process is characterized by the activation of the TGF- β pathway. We found that the expression of GCLs was significantly decreased in the obstructed kidney after 5, 10, and 15 days of UUO (Fig. 10A, B and Supplementary Fig. S5B). As expected, TGF- β and fibronectin levels were significantly higher after 5 days (Fig. 10B right panel). To evaluate further

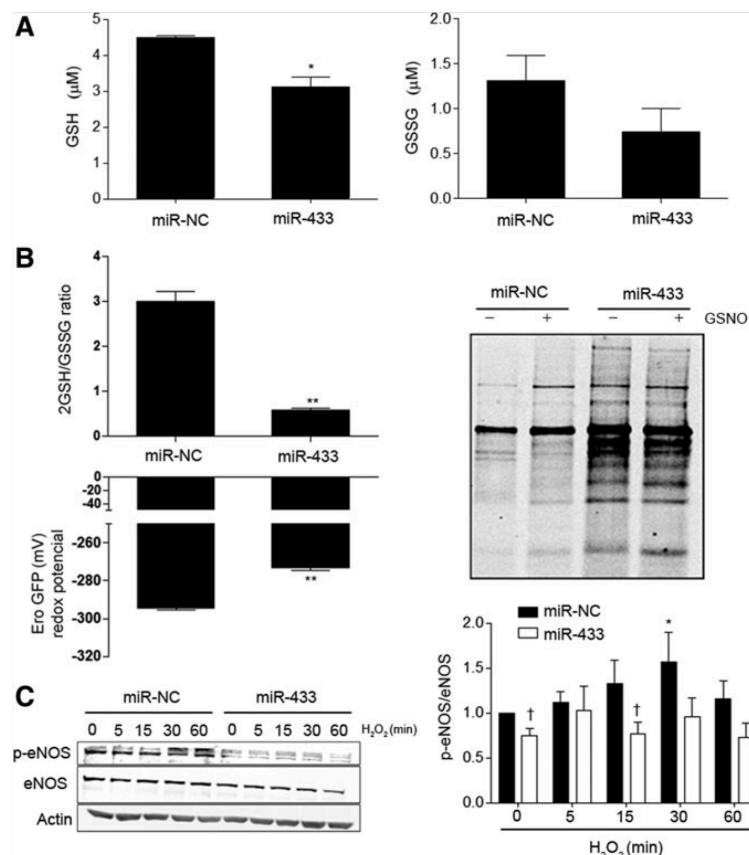


FIG. 4. miR-433 shifts the redox balance of vascular endothelial cells toward a pro-oxidative state. (A) HUVEC were transfected with miR-433 (40 nM, 48 h) or control miRNA (miR-NC), and GSH (left) and GSSG (right) levels were determined as indicated in methods. Bar graph represents mean \pm SEM of at least $n = 3$ experiments (B) The 2GSH/GSSG ratio and redox potential (Ero GFP) were determined in HUVEC after transfection with miR-433 (40 nM, 48 h) or miR-NC as indicated in methods. Bar graphs represent mean \pm SEM of $n \geq 3$. Global S-glutathionylation (right panel) was studied by labeling cells with BIOGEE. Cells were transfected with miR-433 or miR-NC and treated with GSNO (50 μ M, 1 h) before labeling. Pull-downs of samples were analyzed with antistreptavidin. The blot is representative of $n = 3$. (C) HUVEC were transfected with miR-433 (40 nM, 48 h), were kept without FBS for at least 6 h before treatment with H₂O₂ (200 μ M) for the indicated time points, and analyzed by Western blot against p-eNOS (S1177) and total eNOS. The bar graph (right panel) represents the quantification of the ratio p-eNOS/eNOS in $n = 4$ blots. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ with regard to control. † $p < 0.05$ with regard to the corresponding control time point. BIOGEE, biotinylated glutathione ethyl ester; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GSSG, oxidized form of glutathione; GSH, glutathione.

renal damage, two novel described biomarkers, kidney injury molecule 1 (*Kim-1*), related to the transition from acute to chronic renal damage (25, 47) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (*Ngal*), an early marker of kidney disease (12), were also evaluated. *Ngal* and *Kim-1* gene expression became increased at 5 and 10 days after UUO surgery compared with control mice (Supplementary Fig. S5A). Importantly, miR-433 was also significantly upregulated in the obstructed kidney at 5 days post-UUO (Fig. 10C), supporting the notion that miR-433 is involved in the reduction of GCLs levels promoted by UUO. Collectively, these results suggest not only that both UUO and BDL are good models for exploring TGF- β -mediated inhibition of GCLs but also, and more importantly, that miR-433 reveals itself as a potential

mediator of injury and fibrogenesis through its inhibitory action on GCLs expression.

Discussion

Since their discovery, miRNAs have progressively moved to central stage in our understanding of the post-transcriptional regulation of gene expression (1, 4, 5, 18); it is now difficult to conceive a cellular pathway in which these small molecules do not play an important regulatory role. However, only very recently has the contribution of miRNAs been formally addressed in the field of redox biology (11, 46). It is now clear that redox stress modulates miRNAs biogenesis (43, 52, 67) and, indeed, miRNAs control redox homeostasis

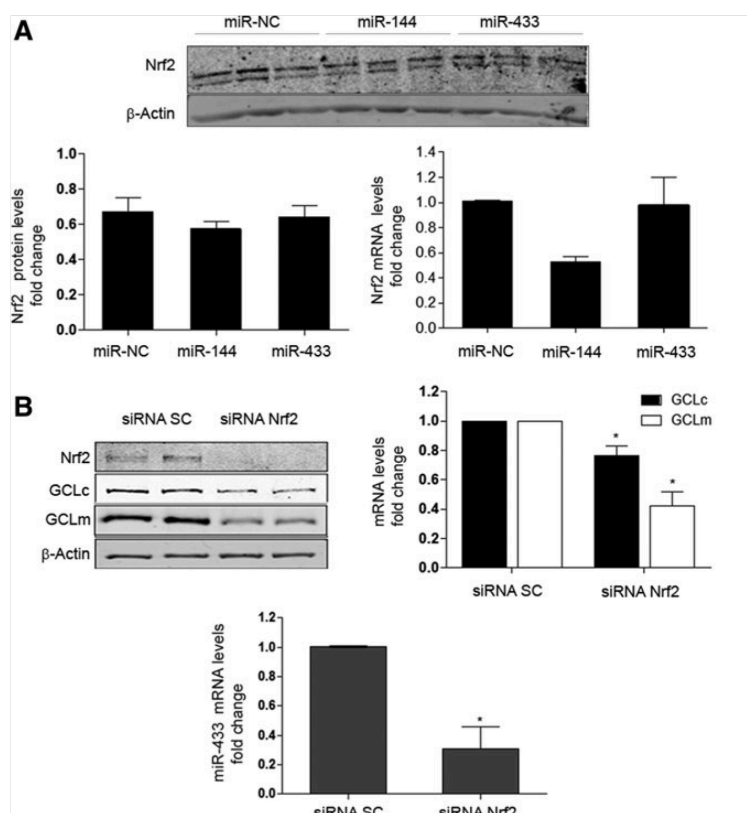


FIG. 7. miR-433 does not regulate Nrf2, but Nrf2 is necessary for the full expression of GCLs and miR-433. (A) Shown on top is a Western blot depicting Nrf2 protein levels in HUVEC transfected with a negative control (miR-NC), miR-144, or miR-433 (all 40 nM, 48 h). Bar graphs represent mean \pm SEM of $n \geq 3$ experiments for protein (left) and mRNA levels (right). (B) Effect of Nrf2 RNA silencing on GCLc and GCLm expression (protein and mRNA levels) in HUVEC. Representative Western blot (top left) of Nrf2 and GCLs protein levels after treatment with siRNA control (SC) or siRNA for Nrf2 (40 nM, 48 h). Bar graphs represent GCLs mRNA (top right panel) and miR-433 (lower panel) levels after Nrf2 silencing, mean \pm SEM of at least three experiments, * $p < 0.05$ with regard to siRNA control. Nrf2, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; siRNA, small-interfering RNA.

vasoconstriction, perhaps indicating that only precise levels of GSH allow appropriate homeostatic responses. Our results are consistent with the idea that reduced levels of GSH mediated by miR-433 result in functional biochemical changes associated to endothelial dysfunction such as increased global and specific S-glutathionylation (Fig. 4B and Supplementary Fig. S2) and diminished eNOS activation (Fig. 4C). These data suggest that GCL is a key enzyme whose intact functionality is indispensable for a correct endothelial and vascular response.

Beyond the direct effects of miR-433 on endothelial function derived from the abrogation of GSH synthesis and reduced nucleophilic tone, we have explored other potential pathophysiological consequences. Here, we focused on the process of fibrogenesis for several reasons: (1) There is an established link between oxidative stress and fibrosis mainly due to the reciprocal relationship between TGF- β , a major profibrotic cytokine, and redox homeostasis (21, 50); (ii) The ability of TGF- β to downregulate the expression of GCL has been known for over a decade. In this regard, TGF- β has been

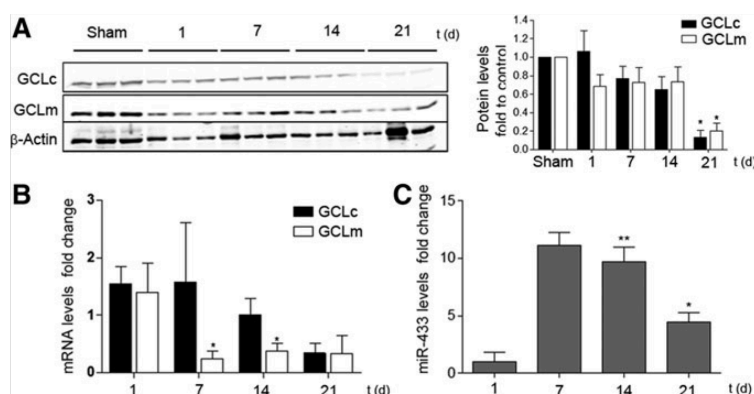


FIG. 8. Bile duct ligation induces GCLs downregulation and increases miR-433 levels. (A) Western blot showing GCLc and GCLm protein levels of whole livers at 1, 7, 14, and 21 days postoperation. Bar graph represents densitometric analyses from at least three mice (mean \pm SEM, * $p < 0.05$ with regard to sham-operated mice). (B) GCLc and GCLm mRNA expression in operated livers analyzed by qPCR. (C) miR-433 expression in operated livers analyzed by qPCR. Bar graphs represent RNA levels, mean \pm SEM $n \geq 3$ * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ with regard to 1 day time point.

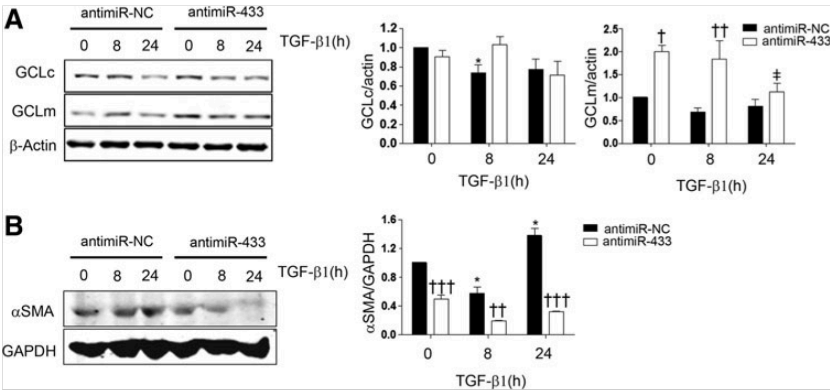
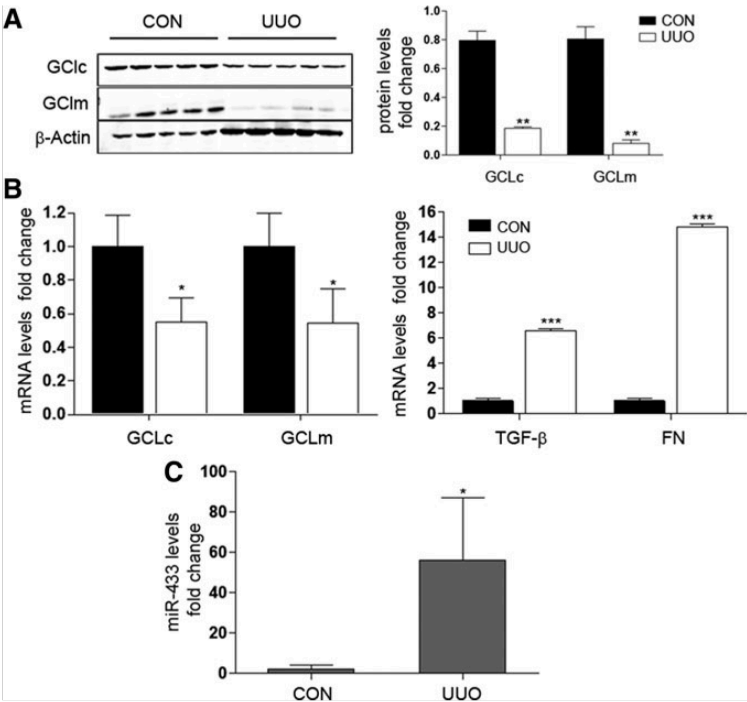


FIG. 9. Antagonism of miR-433 prevents TGF- β -induced GCLs downregulation and fibrogenic phenotype in hepatic cells. (A) GCLc and GCLm protein analysis in Huh7 cells transfected with anti-miR control (anti-miR-NC) or anti-miR-433 (both 40 nM, 48 h) and treated or not (0 h) with 5 ng/ml TGF- β 1 for 8 and 24 h. Bar graphs represent densitometric quantifications of protein levels ($n \geq 3$, mean \pm SEM). **(B)** The blot depicts α -SMA protein levels in Huh7 cells transfected with 40 nM anti-miR-433 (48 h) and treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 8 and 24 h. Bar graphs represent densitometric analyses of protein levels, mean \pm SEM $n \geq 3$; * $p < 0.05$ with regard to control untreated anti-miR-NC; † $p < 0.05$ with regard to control untreated anti-miR-433; ‡ $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ with regard to corresponding control time points. α SMA, α -smooth muscle actin; TGF- β 1, transforming growth factor β 1.

shown to decrease GSH in various cell types. The mechanism appears to relate to the inhibition of GCL gene expression due to the hindrance of Nrf2 binding to the ARE sequence promoted by the competition of Smad3 or small Maf proteins (3, 16, 27, 53, 55). (iii) A recent important report has shown that miR-433 is upregulated by TGF- β 1 and is relevant to the

development of renal fibrosis (32). By using two different experimental models of organ fibrosis in the kidney and liver, UUO and BDL respectively, we confirmed the repression of GCL expression under the induction of fibrogenesis (Figs. 8 and 10A, B). These observations were recapitulated by the exposure of liver-derived cells to TGF- β 1. An important

FIG. 10. Renal fibrosis caused by UUO is associated to GCLc and GCLm downregulation and elevated levels of miR-433. (A) Representative Western blot of GCLc and GCLm renal expression levels in UUO model at 5 days postoperation compared with nonobstructed contralateral (CON) kidney. Bar graphs correspond to densitometric analyses from at least four mice from each group (mean \pm SEM). **(B)** Renal gene expression of GCLc, GCLm, TGF- β , and FN with UUO during 5 days was analyzed by qPCR. **(C)** Renal miR-433 expression was determined by qPCR in contralateral (CON) or obstructed (UUO) kidneys at 5 days postsurgery. Bar graphs represent quantifications of RNA levels, mean \pm SEM, $n \geq 3$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ with regard to contralateral kidney. FN, fibronectin; UUO, unilateral ureteral obstruction.



novelty is that antagonism of miR-433 prevented the down-regulation of GCLs in this cell type (Fig. 9A). We believe that this finding adds new mechanistic insights to the reports mentioned earlier and allows us to propose a model (Fig. 11) in which fibrotic stimuli, such as TGF- β 1, downregulate GCLs and GSH levels by specifically inducing miR-433. We are tempted to propose a scenario in which a biphasic response is mounted in the context of inflammation, leading to fibrosis. In the early stage of damage, the expression of GCLs is quickly upregulated, mediated by Nrf2 activation. When the exposure to injury persists, as is the case in profibrotic TGF- β -dependent processes, miR-433 expression increases progressively, reducing GCLs expression and GSH levels. This, in turn, results in an unbalance in the nucleophilic cellular tone in the cell and could contribute toward limiting miR-433 expression. However, persistent damage overcomes this situation, leading to deposition of extracellular matrix (ECM) proteins and fibrosis.

The term “redoximiRs” has been recently proposed to describe a set of miRNAs that participate in redox responses both as direct regulatory molecules of the post-transcriptional expression of several pathways and as indirect modulators of the redox homeostatic response (11). In addition, the term “fibromiRs” has been coined to suggest the orchestrated influence of a panoply of miRNAs participating in the regulation of fibrogenesis through several mechanisms (51). As expected, and even though this has not yet been formally established, these two functional families of miRNAs overlap. We have now identified a new member, miR-433, which we suggest belongs to both subgroups of miRNAs due to its capacity to regulate the levels of a critical target, GCL, that is essential for homeostatic and hormetic redox responses, including those involved in fibrogenesis (27). We believe that changes observed in the levels of miR-433 in response to variations in the redox state are specific. As shown in Supplementary Figure S6, both the redoximimic miR-34a (61, 64) and the fibromimic miR-21 (49, 51) behave similarly to miR-433 when exposed to BSO. However, when Nrf2 was silenced,

miR-34a and miR-21 exhibited a tendency to increase. In the UUO model, both miRNAs were not significantly upregulated, in contrast to miR-433. Corroboration of this belief should arrive from the study of further pathophysiological scenarios where redox responses are already known to be key players in the process of organ fibrosis.

Materials and Methods

Reagents

H₂O₂, L-BSO, N-ethylmaleimide (NEM), and GSNO were purchased from Sigma. BIOGEE was purchased from Life's Technologies. TGF- β 1 was purchased from Vitro.

Cell culture

HUVEC were obtained from umbilical cords of normal deliveries (after approval by the ethics committee of the Hospital “Ruber Internacional”). For isolation, umbilical cords were digested with 0.1% collagenase at 37°C for 20 min. Endothelial cells were collected and grown on 0.2% gelatin with Medium EGM2 (Lonza) at 37°C in 5% CO₂. Human tumor hepatic cells, HepG2 and Huh7, were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% penicillin-streptomycin, and L-glutamine and nonessential amino acids at 37°C in 5% CO₂. COS-7 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2% penicillin-streptomycin at 37°C in 5% CO₂.

Transfection of miRNA mimics and miRNA anti-miRNAs in human cells. HUVEC at 70% confluence were transfected with 40 nM mirVana mimic (miR-433) or with 40 nM anti-miR miRNA inhibitor (anti-miR-433) (Life Technologies) by utilizing Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and studied 48 h later. In all experiments, an equal concentration of a non-targeting control mimic sequence (miR-NC) or an anti-miR negative control (anti-miR-NC) sequence was used as a control for nonsequence-specific effects in miRNA experiments.

3'-UTR luciferase reporter assays

cDNA fragments corresponding to the 3'-UTRs of human GCLc and GCLm were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA extracted from HUVEC with *Xho*I and *Nor*I linkers. The PCR products were directionally cloned downstream of the Renilla luciferase open reading frame in the psiCHECK2 vector (Promega), which also contains a constitutively expressed firefly luciferase gene, which is used to normalize transfections. Site-directed mutations in the seed region of predicted miR-433 sites within the 3'-UTRs were generated by using the Multisite-QuikChange directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. All constructs were sequenced before use to confirm their proper structure. COS-7 cells were plated into 12-well plates and cotransfected with 125 μ g of the indicated 3'-UTR luciferase reporter vectors and the miR-433 mimic or negative control by using Lipofectamine 2000. Luciferase activity was measured by using the Dual-Glo luciferase assay system (Promega). Renilla luciferase activity was normalized to the corresponding firefly luciferase activity and plotted as a percentage of the control. Experiments were performed in triplicate samples at least thrice.

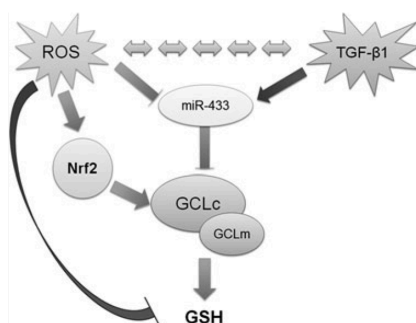


FIG. 11. Proposed model of interaction of miR-433 with regulators and targets. miR-433 is susceptible to regulation by ROS and TGF- β . ROS induces activation of the Nrf2 pathway, an important mediator in the expression of GCLs. On the other hand, ROS and TGF- β are reciprocally regulated. An increase in the activation in TGF- β results in elevated miR-433 levels targeting GCLc and GCLm, contributing to both reduced GSH levels and nucleophilic tone. ROS, reactive oxygen species.

miR-433 TARGETS GCL AND INHIBITS GSH BIOSYNTHESIS

11

Western blot and densitometric analysis

After treatment, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in RIPA lysis buffer (25 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate solution, 1 mM PMSF, 0.2 mM Na_3VO_4 , and 0.2 mM NaF). Cells were harvested by scraping, and proteins were analyzed by Western blot as previously described. Blots were probed with anti-GCLc (generous gift of Dr. Kavanagh's laboratory), anti-GCLm and anti-Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology), and anti- β -actin antibody (Sigma). eNOS and p-eNOS (Ser1177) antibodies were purchased from Cell Signaling. Secondary antibodies against rabbit and mouse were from LI-COR. Densitometry of $n \geq 3$ Western blots was done using β -actin or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as housekeeping controls for the total levels of protein loaded. p-eNOS analysis was corrected by the levels of eNOS, after normalization with β -actin. These analyses were represented in bar graphs showing the mean \pm SEM of protein with regard to controls.

Real-time PCR

Total RNA and miRNA were isolated with miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mRNA sample using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) or in the case of miRNAs, Universal cDNA Synthesis and Master Mix (Exiqon). cDNA expression was analyzed by determining SYBR green-based real-time quantitative PCR with Bio-Rad master mix, using specific primers (Sigma). miRNA expression was determined using specific miRNA Locked Nucleic Acid (LNATM) PCR primers (Exiqon) or for tissue samples, specific Taqman probes (Life Technologies). The relative quantification of gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (35). Using this method, we obtained the fold changes in gene expression normalized to an internal control gene, GAPDH or U6 snRNA, respectively.

Small-interfering RNA design and transfection

HUVEC were transfected with specific small-interfering RNA (siRNA)-targeting constructs as previously described and analyzed for the presence of Nrf2 (40 nM, 48 h), GCLc, and GCLm (40 nM, 48 h). Duplex siRNA-targeting constructs were purchased from Ambion (Life Technologies).

GSH assay

Reduced and oxidized forms of GSH were measured in HUVEC utilizing GSH-Glo assay and 2GSH/GSSG assay (Promega) according to their protocol.

roGFP2 probes

Redox status was measured using ro-GFP adenovirus probe (19, 41). HUVEC were transfected with the appropriate miRNA as described, left for 24 h, infected for 2 h, and washed with PBS and the medium was replaced. 2GSH/GSSG ratio was analyzed after 24 h by fluorescence-activated cell sorting after blocking with NEM 100 μM for 5 min. They were then fixed with paraformaldehyde 4% at 37°C for 5 min. The samples were excited by FL1 (485 nm) and FL8 (405 nm)

lasers, and emission was recorded at 552 nm. The ratio was calculated by analyzing the values of fluorescence obtained with the reduced form (485 nm) divided by those of the oxidized form (405 nm).

Protein S-glutathionylation assay

HUVEC were transiently transfected for 48 h, and were deprived of FBS 16 h before treatments. They were treated with GSNO 50 μM for 1 h, and then incubated with BIO-GEE for 30 min. Cells were lysed in RIPA lysis buffer. S-Glutathionylated proteins were precipitated with A-Sepharose beads (Thermo Scientific) and analyzed by Western blot in nonreducing conditions with antistreptavidin antibody (LI-COR).

Protein 3-nitro-tyrosine assay

HUVEC were transiently transfected for 48 h, and were deprived of FBS at least 6 h before treatments. They were treated with SIN-1 500 μM for 1 h. Cells were lysed in RIPA lysis buffer and analyzed by Western blot in nonreducing conditions with anti-3-Nitro-Tyr antibody (Millipore).

Bile duct ligation

Studies were conducted according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Male C57BL/6 mice (3 months old) were anesthetized and bile duct was ligated, as described (73). In addition, another group of mice was subjected to surgery without ligation (Sham). Animals were sacrificed at 1, 7, 14, and 21 days after surgery. Liver was snap frozen in liquid nitrogen for RNA and protein studies.

Unilateral ureteral obstruction

Studies were conducted according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Male C57BL/6 mice (12–14-week-old) were anesthetized, the left ureter was ligated, and the kidney was obstructed ($n=4$ –8/group), using the contralateral kidney as control (nonobstructed), as previously described (13). Animals were sacrificed at 5, 10, and 15 days after surgery. Kidneys were perfused *in situ* with cold saline before removal. Half a kidney was snap frozen in liquid nitrogen for RNA and protein studies.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPadPrism (GraphPad Software). Data are expressed as means \pm SEM. Differences among groups with one experimental condition were assessed with Kruskal–Wallis test with Dunn's correction. Two-way ANOVA with Bonferroni correction was used to analyze differences among groups exposed to more than one condition. Differences between only two groups were analyzed with Mann–Whitney two-tailed test.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Acknowledgments

Funding agencies: Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO): SAF 2012-31338 (S.L.), CSD 2007-00020

(S.L.), Instituto de Salud Carlos III RD12/0021/0009 (S.L. and M.R.-O.), PI11/01854 (M.R.-O.), Comunidad de Madrid "Fibroteam" S2010/BMD-2321 (S.L. and M.R.-O.), and Fundación Renal "Íñigo Álvarez de Toledo," all of which are in Spain. This study was supported by COST actions BM-1203 (EU-ROS) and BM-1005 (ENOGAS). C.E.-D is a fellow of the FPI program from MINECO. The authors are indebted to all the members of their lab (S.L.) for helpful discussions.

References

- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107: 823–826, 2001.
- Baker AH and van Rooij E. miRNA overexpression induces cardiomyocyte proliferation *in vivo*. *Mol Ther* 21: 497–498, 2013.
- Bakin AV, Stourman NV, Sekhar KR, Rinehart C, Yan X, Meredith MJ, Arteaga CL, and Freeman ML. Smad3-ATF3 signaling mediates TGF-beta suppression of genes encoding Phase II detoxifying proteins. *Free Radic Biol Med* 38: 375–387, 2005.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297, 2004.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233, 2009.
- Breton-Romero R and Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol* 2: 529–534, 2014.
- Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, and Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* 85: 705–717, 2013.
- Crabtree MJ, Brixey R, Batchelor H, Hale AB, and Channon KM. Integrated redox sensor and effector functions for tetrahydrobiopterin- and glutathionylation-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling. *J Biol Chem* 288: 561–569, 2013.
- Chapple SJ, Siow RC, and Mann GE. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 1315–1320, 2012.
- Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, Reyes LA, Hemann C, Talukder MA, Chen YR, Druhan LJ, and Zweier JL. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* 468: 1115–1118, 2010.
- Cheng X, Ku CH, and Siow RC. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: new players in micro-managing redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* 64: 4–11, 2013.
- Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 241: 89–94, 2008.
- Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, and Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1514–1529, 2004.
- Forman HJ, Davies KJ, and Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and parhormesis versus free radical scavenging *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 66: 24–35, 2014.
- Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, and Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med* 30: 86–98, 2009.
- Franklin CC, Rosenfeld-Franklin ME, White C, Kavanagh TJ, and Fausto N. TGFbeta1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J* 17: 1535–1537, 2003.
- Fu Y, Zheng S, Lu SC, and Chen A. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis. *Mol Pharmacol* 73: 1465–1473, 2008.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, and Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835–840, 2010.
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, and Dick TP. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods* 5: 553–559, 2008.
- Hayes JD and Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* 39: 199–218, 2014.
- Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, and Thannickal VJ. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med* 6: 231ra47, 2014.
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, and Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268: 19675–19680, 1993.
- Huang KP and Huang FL. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem Pharmacol* 64: 1049–1056, 2002.
- Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, and Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 67: 129–139, 2011.
- Humphreys BD, Xu F, Sabbisetti V, Grgic I, Naini SM, Wang N, Chen G, Xiao S, Patel D, Henderson JM, Ichimura T, Mou S, Soeung S, McMahon AP, Kuchroo VK, and Bonventre JV. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest* 123: 4023–4035, 2013.
- Huntzinger E and Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12: 99–110, 2011.
- Jardine H, MacNee W, Donaldson K, and Rahman I. Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *J Biol Chem* 277: 21158–21166, 2002.
- Krejsa CM, Franklin CC, White CC, Ledbetter JA, Schieven GL, and Kavanagh TJ. Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *J Biol Chem* 285: 16116–16124, 2010.
- Langston W, Circu ML, and Aw TY. Insulin stimulation of gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression increases endothelial GSH during oxidative stress: influence of low glucose. *Free Radic Biol Med* 45: 1591–1599, 2008.
- Laursen JB, Boesgaard S, Trautner S, Rubin I, Poulsen HE, and Aldershvile J. Endothelium-dependent vasorelaxation is inhibited by *in vivo* depletion of vascular thiol levels:

- role of endothelial nitric oxide synthase. *Free Radic Res* 35: 387–394, 2001.
31. Leonardo TR, Schultheisz HL, Loring JF, and Laurent LC. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat Cell Biol* 14: 1114–1121, 2012.
 32. Li R, Chung AC, Dong Y, Yang W, Zhong X, and Lan HY. The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF-beta/Smad3-Azin1 pathway. *Kidney Int* 84: 1129–1144, 2013.
 33. Liu RM, Liu Y, Forman HJ, Olman M, and Tarpey MM. Glutathione regulates transforming growth factor-beta-stimulated collagen production in fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L121–L128, 2004.
 34. Liu RM, Vayalil PK, Ballinger C, Dickinson DA, Huang WT, Wang S, Kavanagh TJ, Matthews QL, and Postlethwait EM. Transforming growth factor beta suppresses glutamate-cysteine ligase gene expression and induces oxidative stress in a lung fibrosis model. *Free Radic Biol Med* 53: 554–563, 2012.
 35. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
 36. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30: 42–59, 2009.
 37. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3143–3153, 2013.
 38. Lu SC and Ge JL. Loss of suppression of GSH synthesis at low cell density in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 263: C1181–C1189, 1992.
 39. Magenta A, Greco S, Gaetano C, and Martelli F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int J Mol Sci* 14: 17319–17346, 2013.
 40. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205–17208, 1988.
 41. Meyer AJ and Dick TP. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13: 621–650, 2010.
 42. Morgan B, Ezerina D, Amoako TN, Riemer J, Seedorf M, and Dick TP. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol* 9: 119–125, 2013.
 43. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, Russell SJ, Kirkland JL, Blackwell TK, and Kahn CR. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab* 16: 336–347, 2012.
 44. Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, Rathinam M, Henderson G, and Mahimainathan L. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. *PLoS One* 7: e51111, 2012.
 45. Neuschwander-Tetri BA, Nicholson C, Wells LD, and Tracy TF, Jr. Cholestatic liver injury down-regulates hepatic glutathione synthesis. *J Surg Res* 63: 447–451, 1996.
 46. Ouyang YB, Stary CM, White RE, and Giffard RG. The use of microRNAs to modulate redox and immune response to stroke. *Antioxid Redox Signal* 2014 [Epub ahead of print].
 47. Parikh CR and Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 36: S159–S165, 2008.
 48. Pastore A and Piemonte F. S-Glutathionylation signaling in cell biology: progress and prospects. *Eur J Pharm Sci* 46: 279–292, 2012.
 49. Patel V and Noureddine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21: 410–416, 2012.
 50. Peshavariya HM, Chan EC, Liu GS, Jiang F, and Dusting GJ. Transforming growth factor-beta1 requires NADPH oxidase 4 for angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med* 18: 1172–1183, 2014.
 51. Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, Barbry P, and Mari B. FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 35: 119–126, 2014.
 52. Poulsen HE, Specht E, Broedbaek K, Henriksen T, Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Tonnesen M, Nielsen PE, Andersen HU, and Weimann A. RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? *Free Radic Biol Med* 52: 1353–1361, 2012.
 53. Ramani K, Tomasi ML, Yang H, Ko K, and Lu SC. Mechanism and significance of changes in glutamate-cysteine ligase expression during hepatic fibrogenesis. *J Biol Chem* 287: 36341–36355, 2012.
 54. Ravuri C, Svineng G, and Huseby NE. Differential regulation of gamma-glutamyltransferase and glutamate cysteine ligase expression after mitochondrial uncoupling: gamma-glutamyltransferase is regulated in an Nrf2- and NFkappaB-independent manner. *Free Radic Res* 47: 394–403, 2013.
 55. Ryoo IG, Shin DH, Kang KS, and Kwak MK. Involvement of Nrf2-GSH signaling in TGFbeta1-stimulated epithelial-to-mesenchymal transition changes in rat renal tubular cells. *Arch Pharm Res* 2014 [Epub ahead of print].
 56. Sanchez-Gomez FJ, Espinosa-Diez C, Dubey M, Dikshit M, and Lamas S. S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker. *Biol Chem* 394: 1263–1280, 2013.
 57. Sangokoya C, Telen MJ, and Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 116: 4338–4348, 2010.
 58. Santoro MM and Nicoli S. miRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs. *Exp Cell Res* 319: 1324–1330, 2013.
 59. Seelig GF and Meister A. Gamma-glutamylcysteine synthetase. Interactions of an essential sulfhydryl group. *J Biol Chem* 259: 3534–3538, 1984.
 60. Sena CM, Pereira AM, and Seica R. Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 1832: 2216–2231, 2013.
 61. Staszal T, Zapala B, Polus A, Sadakierska-Chudy A, Kiec-Wilk B, Stepień E, Wybranska I, Chojnacka M, and Dembinska-Kiec A. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol Arch Med Wewn* 121: 361–366, 2011.
 62. Sun WM, Huang ZZ, and Lu SC. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochem J* 320 (Pt 1): 321–328, 1996.
 63. Tan KP, Yang M, and Ito S. Activation of nuclear factor (erythroid-2 like) factor 2 by toxic bile acids provokes adaptive defense responses to enhance cell survival at the emergence of oxidative stress. *Mol Pharmacol* 72: 1380–1390, 2007.
 64. Truong Do M, Gyun Kim H, Ho Choi J, and Gwang Jeong H. Metformin induces microRNA-34a to downregulate the Sirt1/Pgc-1alpha/Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild-type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents. *Free Radic Biol Med* 74: 21–34, 2014.
 65. Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, and Ortiz A. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol* 46: 765–776, 2014.
 66. Ucero AC, Goncalves S, Benito-Martin A, Santamaria B, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, and Ortiz

- A. Obstructive renal injury: from fluid mechanics to molecular cell biology. *Open Access J Urol* 2: 41–55, 2010.
67. Ungvari Z, Tucsek Z, Sosnowska D, Toth P, Gautam T, Podlutzky A, Csiszar A, Losonczy G, Valcarcel-Ares MN, and Sonntag WE. Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68: 877–891, 2013.
 68. van Rooij E, Marshall WS, and Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 103: 919–928, 2008.
 69. Weldy CS, Luttrell IP, White CC, Morgan-Stevenson V, Bammler TK, Beyer RP, Afsharinejad Z, Kim F, Chitale K, and Kavanagh TJ. Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene Gclm modulate vascular reactivity in mice. *Free Radic Biol Med* 53: 1264–1278, 2012.
 70. White K, Dempsey Y, Caruso P, Wallace E, McDonald RA, Stevens H, Hatley ME, Van Rooij E, Morrell NW, Maclean MR, and Baker AH. Endothelial apoptosis in pulmonary hypertension is controlled by a microRNA/programmed cell death 4/caspase-3 axis. *Hypertension* 64: 185–194, 2014.
 71. Wild AC, Moinova HR, and Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 274: 33627–33636, 1999.
 72. Yang H, Ko K, Xia M, Li TW, Oh P, Li J, and Lu SC. Induction of avian musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins by toxic bile acid inhibits expression of glutathione synthetic enzymes and contributes to cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* 51: 1291–1301, 2010.
 73. Yang H, Ramani K, Xia M, Ko KS, Li TW, Oh P, Li J, and Lu SC. Dysregulation of glutathione synthesis during cholestasis in mice: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Hepatology* 49: 1982–1991, 2009.
 74. Zhou Y, Xiong M, Niu J, Sun Q, Su W, Zen K, Dai C, and Yang J. Secreted fibroblast miR-34a induces tubular cell apoptosis in fibrotic kidney. *J Cell Sci*, 127(Pt 20): 4494–4506, 2014.

Address correspondence to:

Dr. Santiago Lamas

Departamento de Biología Celular e Inmunología

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid 28049

Spain

E-mail: slamas@cbm.csic.es

Date of first submission to ARS Central, June 18, 2014; date of final revised submission, October 9, 2014; date of acceptance, October 29, 2014.

Abbreviations Used

AP-1 = activator protein 1
 ARE = antioxidant response element
 ATP = adenosine triphosphate
 BDL = bile duct ligation
 BIOGEE = biotinylated glutathione ethyl ester
 CON = contralateral
 DCF = 2',7'-Dichlorofluorescein
 DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium
 ECM = extracellular matrix
 eNOS = endothelial nitric oxide synthase
 FBS = fetal bovine serum
 FN = fibronectin
 GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
 GCL = γ -glutamyl-cysteine ligase
 GCLc = glutamyl-cysteine ligase catalytic subunit
 GCLm = glutamyl-cysteine ligase modifier subunit
 GS = glutathione synthase
 GSH = glutathione
 GSNO = S-nitrosoglutathione
 GSSG = oxidized form of glutathione
 H₂O₂ = hydrogen peroxide
 Hsa = *Homo sapiens*
 HUVEC = human umbilical vein endothelial cells
 Kim-1 = kidney injury molecule 1
 L-BSO = L-buthionine-sulfoximine
 microRNA = miRNA
 Mmu = *Mus musculus*
 NEM = N-ethylmaleimide
 NF κ B = nuclear factor κ B
 Ngai = neutrophil gelatinase-associated lipocalin
 Nrf2 = nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
 PBS = phosphate-buffered saline
 PCR = polymerase chain reaction
 PM = point mutation
 Ptr = *Pan troglodytes*
 Rno = *Rattus norvegicus*
 ROS = reactive oxygen species
 SIN-1 = 3-morpholiniosydnonimine
 siRNA = small-interfering RNA
 TGF- β 1 = transforming growth factor β 1
 UTR = untranslated region
 UUO = unilateral ureteral obstruction
 α SMA = α -smooth muscle actin

Supplementary Data

Supplementary Methods

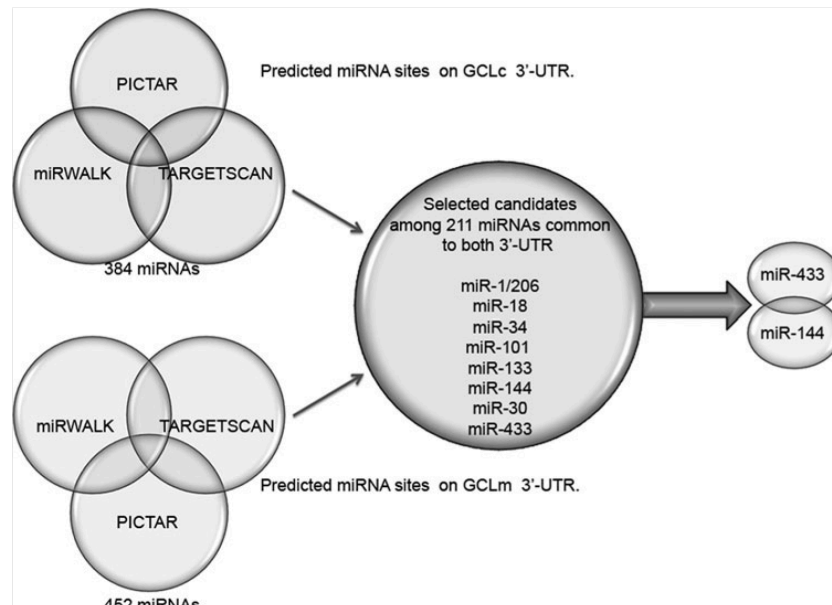
Endothelial nitric oxide synthase immunoprecipitation

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were transiently transfected for 48 h, and were deprived of fetal bovine serum at 16 h before treatments. They were treated with S-nitrosoglutathione (GSNO) 50 μ M for 1 h. Cells were lysed in RIPA lysis buffer, and 60 μ g of total lysate was incubated with 0.25 μ g of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) antibody in a final volume of 50 μ l for 2 h, under stirring at 4°C. After this incubation, 50 μ l of protein A/G Sepharose equilibrated in lysis buffer 1:1 was added and incubated for 2 h with stirring at 4°C. After this period, the lysates were centrifuged at 6000 rpm for 5 min, and the un-

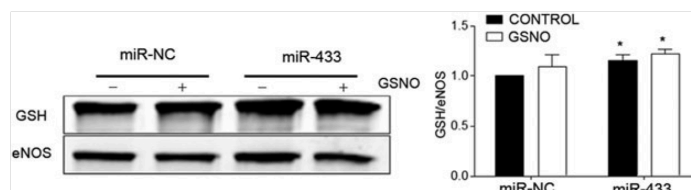
bound fraction was recovered. The protein bound to the sepharose was washed thrice with lysis buffer to remove nonspecific binding, eluted in Laemmli loading buffer 1 \times , and analyzed by Western blotting in nonreducing conditions with glutathione (GSH) and eNOS antibodies.

Reactive oxygen species production

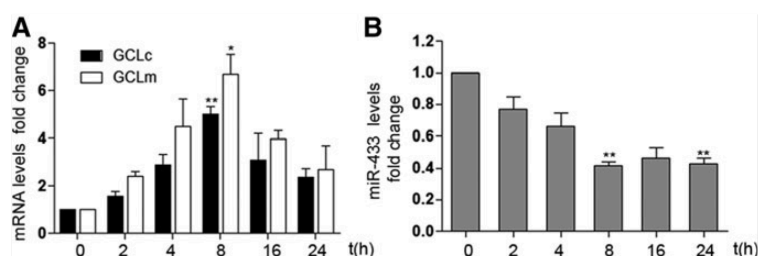
2,7-dichlorofluorescein probe (DCF) was used for general reactive oxygen species (ROS) detection. HUVEC were treated under different experimental conditions, and then incubated with DCF (2.5 μ M) for 30 min at 37°C. ROS production was analyzed by flow cytometry using the FL1 channel.



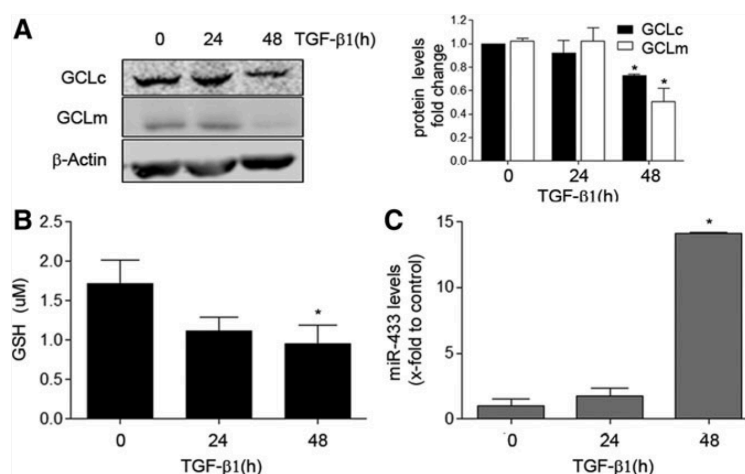
SUPPLEMENTARY FIG. S1. *In silico* prediction of GCLs targets by the analysis of human GCLC 3'-UTR and GCLM 3'-UTR. Using three different data bases, Targetscan, miRwalk, and PICTAR, microRNAs common to both 3'-UTRs were selected. Among these, microRNAs with the best scores were identified. miR-433 and miR-144 were ultimately selected for the number of seed sequences in both 3'-UTRs and for their relationship with the Nrf2 pathway, respectively. GCLC, glutamyl-cysteine ligase catalytic subunit; GCLM, glutamyl-cysteine ligase modifier subunit; Nrf2, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; UTR, untranslated regions.



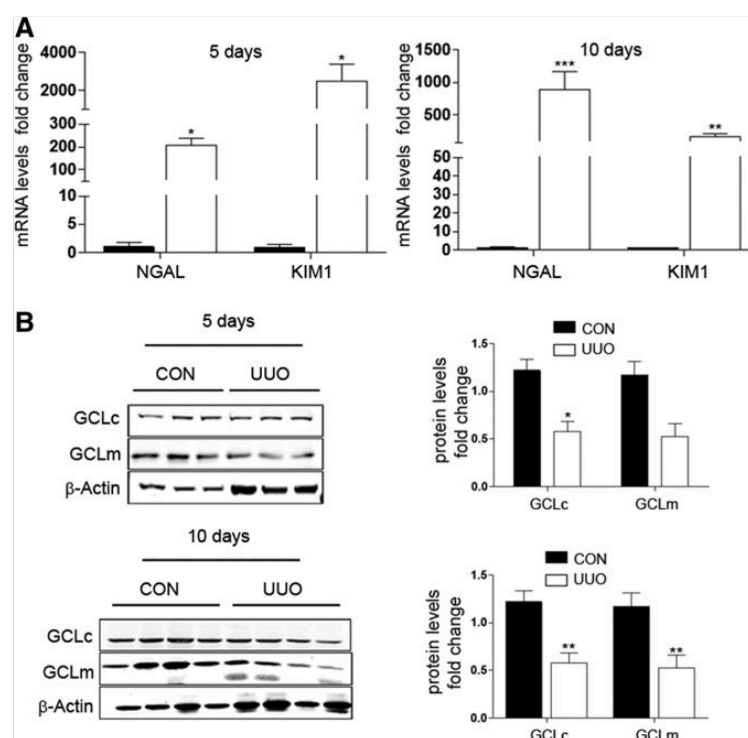
SUPPLEMENTARY FIG. S2. miR-433 promotes S-glutathionylation of eNOS. Specific S-glutathionylation of eNOS was studied by immunoprecipitation of eNOS in HUVEC transfected for 48 h with miR-NC or miR-433 (both 40 nM). Cells were treated with 50 μ M GSNO for 1 h. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation against eNOS as detailed in supplementary methods, and specific S-glutathionylation was analyzed by Western blotting against GSH. Bar graph represents mean \pm SEM of densitometric analysis of $n=4$, * $p<0.05$ regard to control in the absence of miR-433. eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GSH, glutathione; GSNO, S-nitrosoglutathione; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells.



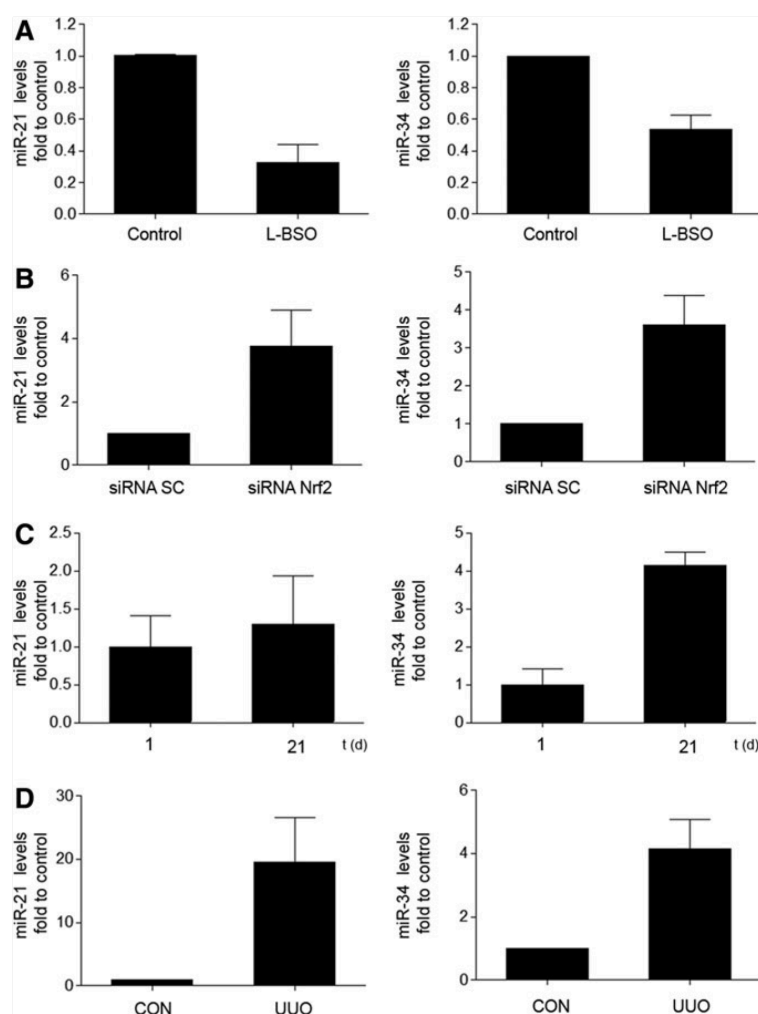
SUPPLEMENTARY FIG. S3. Inverse regulation of GCLs and miR-433 levels by oxidative stress. Bar graphs represent time courses of exposure of HepG2 cells to 200 μ M hydrogen peroxide for the indicated time points. Quantitative PCR was performed for the determination of GCLs (A) and miR-433 (B) RNA levels (mean \pm SEM $n=3$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$ with regard to control. PCR, polymerase chain reaction.



SUPPLEMENTARY FIG. S4. Effect of TGF- β 1 on GCLs expression. Huh-7 cells were grown to 70% confluence and then treated with TGF- β 1 (5 ng/ μ L) for the indicated time points. (A) Representative Western blot of GCLc and GCLm. Bar graph (right panel) represents mean \pm SEM of densitometric analysis ($n=4$). (B) Graph depicts reduced GSH values (mean \pm SEM, $n=4$) in Huh-7 cells treated with TGF- β 1 (5 ng/ μ L) for 24 and 48 h. (C) miR-433 expression levels in Huh-7 cells treated with TGF- β 1 for the indicated time points. The bar graph represents the analysis performed by quantitative PCR, mean \pm SEM, $n=3$. * $p<0.05$ with regard to control. TGF- β 1, transforming growth factor β 1.



SUPPLEMENTARY FIG. S5. Renal fibrosis UUO model characterization. (A) In renal samples, gene expression of Ngal and Kim-1 was studied by quantitative real-time PCR after the indicated periods of UUO. Results are mean \pm SEM as n-fold change compared with its corresponding nonobstructed kidney (contralateral) used as control, $*p < 0.05$ versus control. (B) Representative Western blot of GCLc and GCLm in UUO models at 5 and 10 days postoperation compared with contralateral kidney. Bar graphs correspond to densitometric analyses from more than four mice (mean \pm SEM), $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ with regard to control. Kim-1, kidney injury molecule 1; Ngal, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; UUO, unilateral ureteral obstruction.



SUPPLEMENTARY FIG. S6. Changes of nontargeting GCLs microRNAs in response to the different pro-oxidative stimuli. miR-21 and miR-34a expression levels were analyzed in the same samples as miR-433. **(A)** HUVEC were treated with 500 μ M L-BSO for 8 h. **(B)** HUVEC were transfected with siRNA control (SC) or siRNA for Nrf2 (40 nM, 48 h). **(C)** miR-21 and miR-34a expression in operated livers after 1 and 21 days analyzed by qPCR. **(D)** Renal miRNA expression was determined by qPCR in contralateral (CON) or obstructed (UUO) kidneys at 5 days postsurgery. Bar graphs represent quantifications of miRNA levels, mean \pm SEM, $n \geq 3$. L-BSO, L-buthionine-sulfoximine; qPCR, quantitative polymerase chain reaction.

Review

Francisco J. Sánchez-Gómez, Cristina Espinosa-Díez, Megha Dubey, Madhu Dikshit and Santiago Lamas*

S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker

Abstract: Glutathione is considered the main regulator of redox balance in the cellular milieu due to its capacity for detoxifying deleterious molecules. The oxidative stress induced as a result of a variety of stimuli promotes protein oxidation, usually at cysteine residues, leading to changes in their activity. Mild oxidative stress, which may take place in physiological conditions, induces the reversible oxidation of cysteines to sulfenic acid form, while pathological conditions are associated with higher rates of reactive oxygen species production, inducing the irreversible oxidation of cysteines. Among these, neurodegenerative disorders, cardiovascular diseases and diabetes have been proposed to be pathogenetically linked to this state. In diabetes-associated vascular complications, lower levels of glutathione and increased oxidative stress have been reported. S-glutathionylation has been proposed as a posttranslational modification able to protect proteins from over-oxidizing environments. S-glutathionylation has been identified in proteins involved in diabetic models both *in vitro* and *in vivo*. In all of them, S-glutathionylation represents a mechanism that regulates the response to diabetic conditions, and has been described to occur in erythrocytes and neutrophils from diabetic patients. However, additional studies are necessary to discern whether this modification represents a biomarker for the early onset of diabetic vascular complications.

Keywords: diabetes; glutathione; hyperglycemia; oxidative stress; posttranslational modification; signaling.

*Corresponding author: Santiago Lamas, Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’, Campus Universidad Autónoma, Nicolás Cabrera 1, E-28049, Madrid, Spain, e-mail: slamas@cbm.uam.es

Francisco J. Sánchez-Gómez and Cristina Espinosa-Díez: Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’, Campus Universidad Autónoma, Nicolás Cabrera 1, E-28049, Madrid, Spain

Megha Dubey and Madhu Dikshit: Pharmacology Division, CSIR-Central Drug Research Institute, Lucknow, India

Introduction into glutathione functions and activities

Physiology of glutathione

Glutathione (GSH) is a tripeptide, γ -glutamyl-L-cysteinylglycine, ubiquitously detected in all mammalian tissues. It is preferentially generated in the liver, but it is synthesized by almost all cell types in its reduced form, GSH. The concentration of the disulfide form of glutathione (GSSG) is increased in response to oxidative stimuli (Kaplowitz et al., 1985). Glutathione is the predominant form, in the low millimolar (about 10 mM) range while the oxidized form represents <1% of the reduced form (Akerboom et al., 1982). The redox pair 2GSH/GSSG has been considered a reporter of the redox homeostasis or oxidative stress. The 2GSH/GSSG molar ratio of unstressed wild-type cells is considered to be approximately 100–300:1, corresponding to redox potentials from -220 mV to -240 mV. Recently it has been proposed that the 2GSH/GSSG ratio could be significantly higher (Morgan et al., 2013).

Functions of glutathione

The two basic functions of glutathione are: the detoxifying function; and the regulation of the redox homeostasis. These comprise the detoxification of electrophilic compounds and free radicals and the regulation of the redox balance (~thiol status) depending on the 2GSH/GSSG ratio inside the cell (Meister and Anderson, 1983). However, other secondary functions have been described for glutathione as a reservoir of cysteine, as a modulator of some cellular processes (DNA synthesis, microtubular-related processes and immune function) or as a regulator of nitric oxide homeostasis (Martinez-Ruiz and Lamas, 2005, 2007). In addition, during the past 15 years increasing evidence has accumulated regarding the importance

